



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

IGOR PATRIK RAMOS NEGRÃO

ANÁLISE CITOGENÉTICA COMO BIOINDICADOR PARA PACIENTES COM  
DIAGNÓSTICO SUGESTIVO DE ALZHEIMER

BELÉM - PA  
2013

IGOR PATRIK RAMOS NEGRÃO

ANÁLISE CITOGENÉTICA COMO BIOINDICADOR PARA PACIENTES COM  
DIAGNÓSTICO SUGESTIVO DE ALZHEIMER

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará para obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Neurociências

Linha de Pesquisa: Neuroplasticidade

Orientador: Antônio Pereira Júnior

Co-orientador: Carlomagno Pacheco Bahia

BELÉM - PA  
2013

IGOR PATRIK RAMOS NEGRÃO

ANÁLISE CITOGENÉTICA COMO BIOINDICADOR PARA PACIENTES COM  
DIAGNÓSTICO SUGESTIVO DE ALZHEIMER

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará para obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Neurociências

Linha de Pesquisa: Neuroplasticidade

Orientador: Antônio Pereira Júnior

Co-orientador: Carlomagno Pacheco Bahia

**Banca Examinadora:**

Prof. Drº. Antonio Pereira Júnior  
Orientador - Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

Prof. Drº. Carlomagno Pacheco Bahia  
Co-orientador - Universidade Federal do Pará (UFPA)

Avaliador:  
Profª. Drº. Paulo José Siqueira do Amaral  
Universidade Federal do Pará (UFPA)

Avaliador:  
Profª. Drª. Lucidia Santiago  
Universidade Federal do Pará (UFPA)

## **FONTES FINANCIADORAS E INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES**

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq  
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior – CAPES

Universidade Federal do Pará – UFPA

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN

À minha Tia Maria Rute Ramos Negrão, pelo amor, carinho, dedicação, paciência e inspiração de cada dia.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao orientador Prof. Dr. Antônio Pereira, pela oportunidade, paciência e confiança, por compreender minhas dificuldades, compartilhar e trilhar comigo por novos caminhos;

Ao co-orientador Prof. Dr. Carlomagno Bahia, pela credibilidade e incentivo em alcançar os melhores resultados sempre;

A Profa. Dra. Cleusa Yoshiko Nagamachi e ao Prof. Julio Júlio César Pieczarka.

Ao Dr. Paulo J. S. do Amaral, Msc. Jorge e a mestranda Jamilly Amaral Pinto.

A todos os integrantes do Laboratório de Neuroproteção e Neuroregeneração Experimental (LNNE/ UFPA), professores e alunos, por todos os momentos que possibilitaram a minha formação enquanto pesquisador.

A minha namorada Aline Matos pela ajuda e incentivo;

A todos os integrantes do Laboratório de Citogenética;

Ao apoio financeiro da CAPES por incentivar a formação na pós-graduação;

A Deus e a Nossa Senhora de Nazaré, pela fé, pela força e pela esperança de que tudo pode dar certo.

"É melhor tentar e falhar,  
que se preocupar e ver a vida passar,  
é melhor tentar, ainda que em vão,  
que se sentar fazendo nada até o final.  
Eu prefiro na chuva caminhar,  
que em dias tristes em casa me esconder.  
Prefiro ser feliz, embora louco,  
que em conformidade viver ”.

Martin Luther King

## RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa que provoca morte neuronal e consequente perda progressiva das funções cognitivas, reduzindo as capacidades de trabalho, interferindo na relação social e no comportamento do paciente. Entre as doenças causadoras de demência, a DA é a mais incidente que as de cunho vascular, numa proporção de 4:1, respectivamente. Além das terapias farmacológicas, os métodos diagnósticos auxiliam na identificação precoce da doença auxiliando o tratamento prévio, assim diminuindo a progressão da doença. Atualmente estudos citogenéticos vêm demonstrando alterações cromossômicas em portadoras da DA e podem auxiliar no diagnóstico da doença. O objetivo desse trabalho foi verificar o potencial da análise cariotípica de linfócitos do sangue periférico como bioindicador diagnóstico da doença de Alzheimer. Para a realização deste trabalho, utilizamos dois grupos de mulheres com 65 anos ou mais, sendo um grupo com (10) portadoras de DA e outro grupo (10) normais. Cada indivíduo foi submetida ao questionário socioeconômico, teste de rastreio cognitivo (MEEM) e à coleta de sangue venoso para cultura de linfócitos e análise cromossômica. Nossos resultados demonstram que o grupo de mulheres portadoras da DA apresentaram elevada taxa de monossomia e trissomia em relação às mulheres normais. Através de estudo de anamnese via questionário, verificamos o estilo de vida de ambos os grupos. Quando comparado a relação das alterações cromossômicas com o nível cognitivo do grupo DA, nós evidenciamos uma tendência inversamente proporcional entre o número de monossomia/trissomia e o desempenho cognitivo. Outro aspecto de nossas análises foi o papel de cada cromossomo ligado à DA. Os cromossomos 1, 14 e 21 não apresentaram trissomia e na verificação da frequência de monossomia, cada cromossomo possui frequência abaixo de 3 % de aneuploidia, ou seja, os cromossomos estudados não possuem uma grande representatividade nas alterações cromossômicas encontradas no estudo.

Palavra chave: Doença Alzheimer, Mosaicismo Cromossômico, Alteração Cromossômica, Monossomia, Trissomia.



## ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease that causes neuronal death and consequent progressive loss of cognitive functions, reducing the capacity for work, interfering with social relationships and behavior of the patient. Among the diseases that cause dementia, AD is the most frequent nature of the vascular a ratio of 4:1, respectively. In addition to the pharmacological therapies, diagnostic methods assist in the early identification of the disease by helping the pretreatment, thus reduced disease progression. Currently cytogenetic studies have demonstrated chromosomal abnormalities in individuals with AD and may aid in the diagnosis of disease. The aim of this study was to investigate the potential of karyotype analysis of peripheral blood lymphocytes as a diagnostic biomarker of Alzheimer's disease. For this work, we used two groups of women aged 65 or more, one group (10) suffering from AD and other normal group (10). Each subject was submitted to the socioeconomic survey, a cognitive screening test (MMSE) and the Venous blood lymphocyte culture and chromosome analysis. Our results demonstrate that the group of women with AD showed high rate of monosomy and trisomy compared to normal women. Through the study of history via questionnaire, we found the lifestyle of both groups. Compared the relationship of chromosomal abnormalities with the cognitive level of the AD group, we evidenced an inverse trend between the number of monosomy / trisomy and cognitive performance. Another aspect of our analysis was the role of each chromosome linked to AD. Chromosomes 1, 14 and 21 showed no trisomy and verify the frequency of monosomy , each chromosome has frequency below 3 % of aneuploidy, i.e., the chromosomes studied did not have a great importance in chromosomal alterations found in the study.

Keyword: Alzheimer's Disease, Chromosomic Mosaicism, Chromosomic Alteration, Monosomy, Trisomy.

## LISTA DE FIGURAS

	Páginas
<b>Figura 1.</b> Imagem do neuropatologista Alois Alzheimer e sua paciente August Deter.....	3
<b>Figura 2.</b> Prevalência de demência por gênero e idade no continente Europeu.....	4
<b>Figura 3.</b> Incidência da demência em geral e seus subtipos (tipo Alzheimer e tipo vascular) em mil pessoas por ano no continente Europeu.....	5
<b>Figura 4.</b> Visualização temporal do acúmulo da proteína beta amiloide no encéfalo, iniciando pelo córtex e seguindo para regiões subcorticais: Tons de cinza mostram o grau evolutivo da deposição da proteína Beta amiloide no encéfalo, sendo em níveis avançados a proteína adentrando o tronco encefálico indicado pela seta.....	7
<b>Figura 5.</b> Proteólise da proteína PPA pela via amiloidogênica via não amiloidogênica.....	8
<b>Figura 6.</b> Os vários estágios da formação da placa neurítica.....	9
<b>Figura 7.</b> O desempenho da proteína Tau em neurônios saudáveis e patológicos.....	10
<b>Figura 8.</b> Índice em porcentagem da prevalência do Alzheimer familiar e esporádico.....	11
<b>Figura 9.</b> Cromossomo 21 mostrando a localização gênica da PPA.....	12
<b>Figura 10.</b> Complexo proteico da enzima $\gamma$ secretase e seus constituintes.....	13
<b>Figura 11.</b> Modelo baseado na disjunção cromossômica tipo síndrome de Down.....	16
<b>Figura 12.</b> Divisão precoce do centrômero ocasionando a instabilidade cromossômica.....	17
<b>Figura 13.</b> Imagem esquemática dos grupos experimentais.....	19
<b>Figura 14.</b> Desenho esquemático de obtenção dos dados e a preparação das amostras.....	21
<b>Figura 15.</b> Esquema do procedimento de coloração convencional por Giemsa.....	22
<b>Figura 16.</b> Esquema do procedimento de Bandeamento cromossômico.....	23
<b>Figura 17.</b> Análise das metáfases coradas por meio convencional e bandeamento G.....	24
<b>Figura 18.</b> Principais etapas da hibridização <i>in situ</i> fluorescente.....	25
<b>Figura 19.</b> Dados quantitativos da frequência de monossomia do grupo saudável (controle) e do grupo com doença de Alzheimer (DA).....	31
<b>Figura 20.</b> Dados quantitativos da frequência de trissomia do grupo saudável (controle) e do grupo com doença de Alzheimer (DA).....	32

<b>Figura 21.</b> Correlação direta entre o score neurológico (MEEM) e a frequência de monossomia de mulheres portadoras de Alzheimer.....	33
<b>Figura 22.</b> Correlação direta entre o score neurológico (MEEM) e a frequência de trissomia de mulheres portadoras de Alzheimer.....	33
<b>Figura 23.</b> Correlação direta entre a frequência de monossomia das mulheres saudáveis e idade.....	35
<b>Figura 24.</b> Correlação direta entre a frequência de trissomia das mulheres saudáveis e idade.....	35
<b>Figura 25.</b> Correlação direta entre a frequência de monossomia de mulheres saudáveis (controle) e portadoras da doença de Alzheimer (DA) com a idade.....	36
<b>Figura 26.</b> Correlação direta entre a frequência de trissomia de mulheres saudáveis (CTR) e portadoras da doença de Alzheimer (DA) com a idade.....	36
<b>Figura 27.</b> Hibridização <i>in situ</i> do cromossomo 1 (locus genético da proteína presilina 2).....	37
<b>Figura 28.</b> Frequência relativa de monossomia do cromossomo 1 no grupo controle (CTR) e Alzheimer (DA) e a frequência relativa dos homólogos íntegros de ambos os grupos.....	37

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>3</b>
2.1. HISTÓRICO SOBRE A DOENÇA DE ALZHEIMER.....	3
2.2. DADOS EPIDEMIOLÓGICOS E SÓCIO-ECONÔMICOS SOBRE A DOENÇA DE ALZHEIMER.....	4
2.3. ASPECTO CLÍNICO DA DOENÇA DE ALZHEIMER.....	6
2.4. ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS DA DOENÇA DE ALZHEIMER..	7
<b>2.4.1. Formação da Proteína Beta Amilóide</b> .....	<b>7</b>
<b>2.4.2. Formação do Emaranhado Neurofibrilar</b> .....	<b>10</b>
2.5. FATORES GENÉTICOS ASSOCIADOS COM A DOENÇA DE ALZHEIMER.....	11
<b>2.5.1. Mutação no Gene Da Proteína Precursora Amilóide</b> .....	<b>12</b>
<b>2.5.2. Mutação nos Genes Das Proteínas PSEN-1 E PSEN-2</b> .....	<b>13</b>
<b>2.5.3. Mutação no Gene da Proteína Tau</b> .....	<b>14</b>
<b>2.5.4. Mutação no Gene da Proteína Macroglobulina Alfa 2</b> .....	<b>14</b>
<b>2.5.5. Mutação no Gene da Apolipoproteína E</b> .....	<b>15</b>
2.6. CITOGENÉTICA DA DOENÇA DE ALZHEIMER.....	15
<b>3. OBJETIVO</b> .....	<b>18</b>
3.1. OBJETIVO GERAL.....	18
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>19</b>
4.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	19
4.2. AVALIAÇÃO COGNITIVA DOS PACIENTES E QUESTIONÁRIO SÓCIO ECONÔMICO.....	20
4.3. COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO.....	20
4.4. CULTURA DE LINFÓCITO.....	20
4.5. PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS.....	21
4.6. TÉCNICAS DE CITOGENÉTICA CLÁSSICA.....	22
<b>4.6.1. Coloração Convencional</b> .....	<b>22</b>
<b>4.6.2. Bandeamento Cromossômico</b> .....	<b>22</b>
4.6.2.1. Bandeamento Cromossômico G.....	22
<b>4.6.3. OBTENÇÃO DE DADOS ATRAVÉS DA COLORAÇÃO CONVENCIONA E BANDA G</b> .....	<b>23</b>
4.7. CITOGENÉTICA MOLECULAR.....	24
<b>4.7.1. Hibridização <i>in Situ</i> Fluorescente</b> .....	<b>24</b>
4.7.1.2. Preparação Das Lâminas.....	25
4.7.1.3. Desnaturação das Sondas.....	26
4.7.1.4. Desnaturação do DNA Cromossômico.....	26
4.7.1.5. Hibridização.....	26
4.7.1.6. Lavagens de Estringência.....	26
4.7.1.7. Detecção dos Sinais de Hibridização.....	27
4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	28
<b>4.8.1. Quantificação da Alteração Cromossômica</b> .....	<b>28</b>
<b>4.8.2. Análise de Correlação</b> .....	<b>28</b>
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>29</b>
5.1. CARACTERIZAÇÃO AMOSTRAL E TESTE DE RASTREIO COGNITIVO.....	29
5.2. ANÁLISE DA CITOGENÉTICA CLÁSSICA E BANDEAMENTO	

CROMOSSÔMICO.....	30
5.3. CORRELAÇÃO ENTRE DÉFICIT COGNITIVO E A ALTERAÇÃO CROMOSSÔMICA.....	33
5.4. ENVELHECIMENTO E A ALTERAÇÃO CROMOSSÔMICA.....	35
5.5. ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DE MONOSSOMIA E TRISSOMIA EM PRINCIPAIS CROMOSSOMOS QUE POSSUEM GENES ASSOCIADOS À DA.....	38
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>42</b>
6.1. QUESTIONÁRIO SOCIOECONÔMICO E FATORES DE RISCO.....	42
6.2. TÉCNICAS PARA ESTUDO CROMOSSÔMICO.....	42
6.3. A RELAÇÃO ENTRE O MEEM E AS ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS.....	42
6.4. ESTUDO CROMOSSÔMICO-NUMÉRICO NA DOENÇA DE ALZHEIMER.....	44
6.5 O PAPEL DE CADA CROMOSSOMO NA DOENÇA DE ALZHEIMER.....	45
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>47</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A Doença de Alzheimer (DA), provoca morte neuronal e perda progressiva das funções cognitivas (pensamentos, fala, memória, raciocínio lógico, etc.), gerando degradação do parênquima cerebral (CAMARGO, 2003). O envelhecimento da população mundial, um fenômeno que é mais nítido em países emergentes como o Brasil, implicará num grande aumento da prevalência dessa doença, que acomete principalmente os indivíduos acima dos 65 anos (CAMARGO, 2003). E na busca por terapias eficazes, vários grupos investigaram a ação de fármacos que possam interferir na progressão da fisiopatologia da doença, como os inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE) (SMALL e MAYEUX, 2007).

Esses inibidores são os fármacos mais utilizados atualmente no combate à DA e uns dos primeiros aprovados pela FDA (*US Food and Drug Administration*). Essas drogas diminuem a hidrólise da AChE na fenda sináptica, favorecendo a ativação das vias colinérgicas, conseqüente melhorando estado do paciente (SMALL e MAYEUX, 2007). Outro fármaco bastante utilizado no tratamento da DA é a memantina, um antagonista não competitivo dos receptores *N*-metil-*D*-aspartato (NMDA), que diminui os danos excitotóxicos causados pelo acúmulo do glutamato na fenda sináptica (DEMURO et al., 2010; GOMES-LEAL et al., 2004; MOLINUEVO et al., 2005).

Além das terapias farmacológicas, o desenvolvimento de métodos de diagnóstico precoce é uma arma importante para retardar a progressão da doença (CLARK et al., 2008; FORMAN et al., 2004; GALASKO, 2005). Alguns desses métodos envolvem testes comportamentais e testes de rastreio cognitivo, que vêm se mostrando grandes ferramentas na identificação de déficits associados com a DA: perda de memória, diminuição de atenção, distúrbios de linguagem, deterioração das funções executiva, entre outros. Esses testes, porém, só são eficazes quando o indivíduo já começou a manifestar os sintomas da doença (GALASKO, 2005; PETERSEN, 2004).

O diagnóstico por imagem (ressonância magnética, tomografia computadorizada e tomografia por emissão de pósitrons) também pode auxiliar na identificação da DA, mas só podem ser usados quando há alterações morfológicas significativas provocadas pela perda de células nervosas, ou seja, no estágio avançado da doença (BRUN e ENGLUND, 1986; HICKEY e DONNELLY, 2012; SCHAFER et al., 2012).

Outros estudos procuram identificar possíveis biomarcadores associados com a DA, sendo esses marcadores divididos em dois tipos, bioquímicos e genéticos (BENSEMAIN et

al., 2009; BERTRAM e HAMPEL, 2011; GALASKO, 2005; TROJANOWSKI et al., 2010). As pesquisas bioquímicas são baseadas na detecção de certas proteínas localizadas no líquido cefalorraquidiano (LCR) e associadas com a doença. Os principais alvos são: a proteína  $\beta$  amilóide (beta-amilóide), com 65% de sensibilidade diagnóstica, e a proteína Tau, com 75% de sensibilidade diagnóstica, que se apresentam elevadas nos pacientes acometidos com DA (CLARK et al., 2008; GLENNER e WONG, 1984; HAMPEL et al., 2003). As pesquisas com biomarcadores baseados em alterações genéticas compreendem um dos campos mais promissores para o diagnóstico precoce da DA e focalizam em genes como: *PS1*, *PS2*, *APP*, *Apo E*, *A2M* e *MAPT* (CHARTIER-HARLIN et al., 1991; CHAU et al., 2012; DENG et al., 1996; FORMAN et al., 2004; HOPE et al., 2003; KLUNK et al., 1998; LARNER, A. J. , 2009).

Estudos na área da citogenética vêm demonstrando que indivíduos com demência apresentam uma frequência elevada de alterações cromossômico-numéricas, causando um mosaïcismo cromossômico intenso (IOUROV et al., 2009; MOSCH et al., 2007; SPREMO-POTPAREVIC et al., 2004; YANG et al., 2001). Alguns estudos, entretanto, afirmam que as modificações estruturais do cromossomo não são tão específicas quanto as alterações moleculares, mas apresentam maior viabilidade de diagnóstico em larga escala, devido ao seu relativo baixo custo e menor complexidade nos procedimentos associados (IOUROV et al., 2009)

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. HISTÓRICO SOBRE A DOENÇA DE ALZHEIMER

Alois Alzheimer (Figura 1a), nasceu no dia 14 de junho de 1864 em Markbret Am Main, Alemanha e morreu na cidade de Wroclaw, Polônia em 19 de dezembro de 1915 de uma infecção cardíaca. Sua maior contribuição ocorreu no ano de 1906, quando publicou o caso da paciente Auguste Deter, então com 51 anos (Figura 1b), internada no Hospital Municipal de Lunáticos e Epiléticos de Frankfurt no dia 25 de dezembro de 1901. A paciente apresentava perda progressiva da memória, associada com ansiedade e hostilidade (MAURER et al., 1997). A paciente faleceu após cinco anos de perda cognitiva progressiva, alucinações, delírios e importante prejuízo na função social (MAURER et al., 1997).

Alois Alzheimer realizou necrópsia da paciente e a avaliação histológica identificando a presença dos sinais histopatológicos clássicos da doença: as placas amilóides e os emaranhados neurofibrilares. Alguns anos depois, Kraepelin denominou essa patologia como Doença de Alzheimer e as lesões histológicas ainda são considerados o padrão-ouro para o diagnóstico da doença (DAHM, 2006).

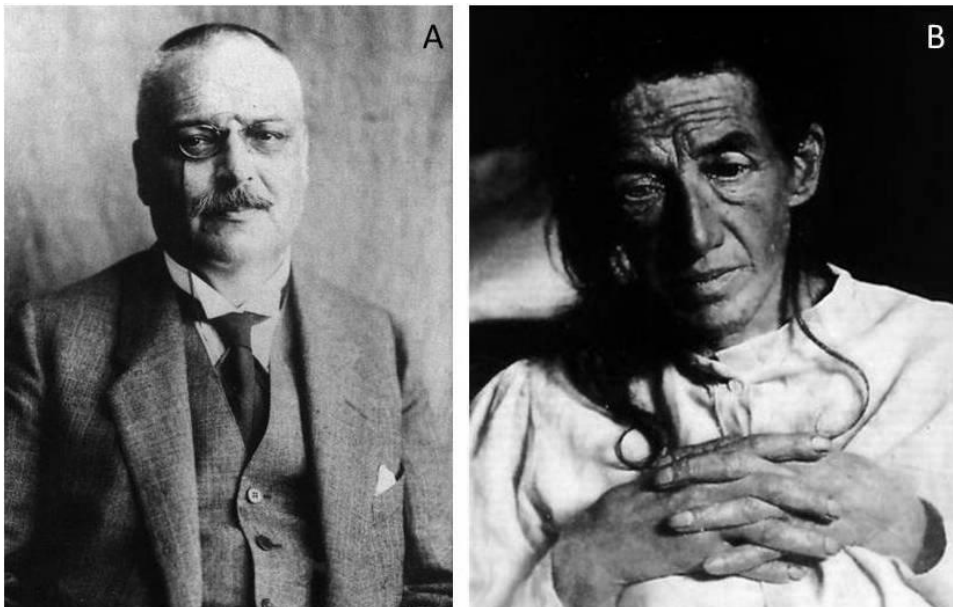


Figura 1:(A) Fotografia do neuropatologista Alois Alzheimer (1864 - 1915) (B) e sua paciente August Deter (1850- 1906) (Fonte: Google)



## 2.2. DADOS EPIDEMIOLÓGICOS E SÓCIO-ECONÔMICOS SOBRE A DOENÇA DE ALZHEIMER

O aumento da perspectiva de vida da população mundial tem sido correlacionado com o grande aumento de incidência das doenças ligadas ao envelhecimento (KINSELLA e VELKOFF, 2001). Em 2050, o Brasil será o sexto país do mundo em número absoluto de idosos (RAMOS et al., 1987) e já a partir de 2025 o Brasil terá mais de 32 milhões de pessoas com idade igual ou superior a 60 anos (CARBONI e REPPETTO, 2007).

Entre as doenças degenerativas ligadas ao envelhecimento, a demência é considerada a de maior prevalência. Essa doença causa o comprometimento global da função cognitiva, de caráter progressivo e permanente, com etiologia complexa, e interferindo nas atividades profissionais, sociais e na vida diária dos indivíduos acometidos (CALDAS, 2003; NITRINI, R., 2002; PRINCE, 2004). Um estudo meta-analítico da prevalência dos casos de demência na Europa demonstrou que as mulheres são mais acometidas com a doença do que os homens (LOBO et al., 1999; PRINCE, 2004) (Figura 2).

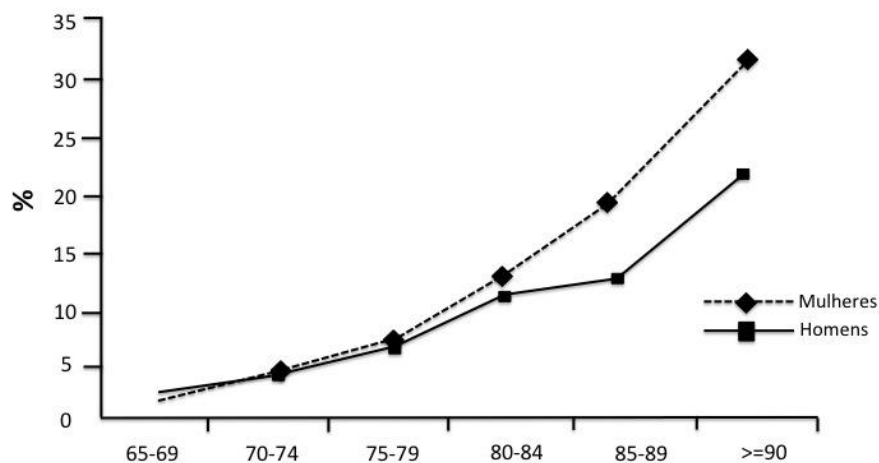


Figura 2: Prevalência de demência por gênero e idade no continente Europeu. Fonte: (LOBO et al., 1999).

Entre as doenças causadoras de demência, a Doença de Alzheimer (DA) é mais incidente que as de cunho vascular (Figura 3), numa proporção de 4:1 respectivamente. Possuindo incidência com níveis que variam de 60 - 80 %. O Brasil se destaca como o país com maior incidência de DA na América do Sul, com 54% dos diagnósticos de demência no subcontinente (LOPES e BOTTINO, 2002). As taxas de ocorrência percentual da DA nas

diferentes faixas etárias são: 65 - 74 anos, 2,5%; 75 - 79 anos, 4%; 80 - 84 anos, 11%; e 85 - 93 anos, 24% (NUSSBAUM e ELLIS, 2003)

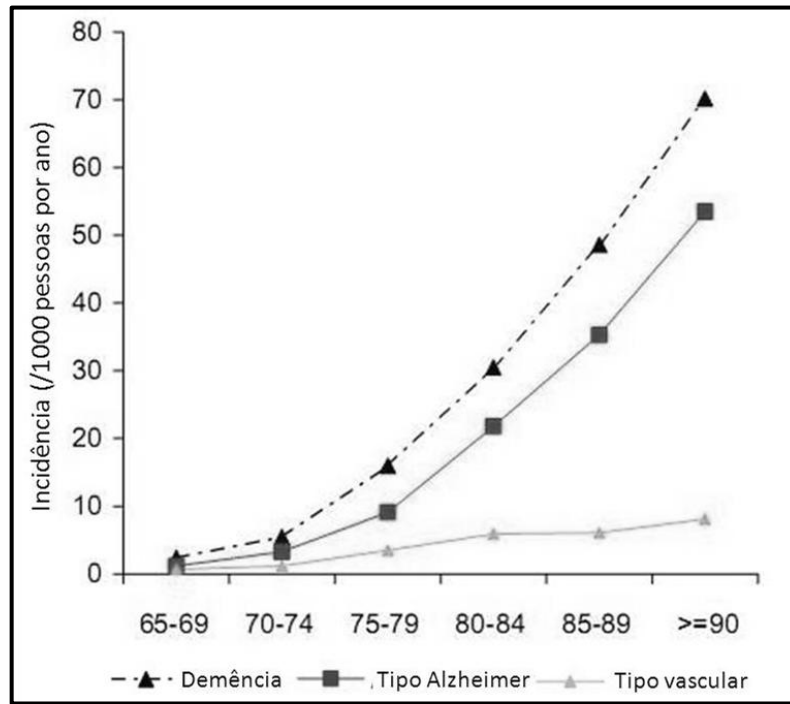


Figura 3: Incidência da demência e seus subtipos (tipo Alzheimer e tipo vascular) em mil pessoas por ano no continente Europeu. Fonte: (FRATIGLIONE et al., 2000).

Dados sobre a prevalência da DA nos Estados Unidos da América (EUA) demonstram que em 2000 o país apresentava cerca de 4,5 milhões de pacientes com a doença e a projeção para 2050 será de 13,2 milhões de pessoas com a DA (HEBERT et al., 2003). Na América do Norte, os cuidados médicos relacionados aos pacientes com Doença de Alzheimer está associado ao custo financeiro gigantesco: o Canadá, por exemplo, possui custos anuais estimados em 3,9 bilhões de dólares canadenses (OSTBYE e CROSSE, 1994).

Em relação aos custos sociais, vários estudos têm demonstrado que a rede de cuidado primário dos pacientes, ou seja, principalmente a família, que representa 80% dos cuidadores, é alvo de grande pressão psicológica (HALEY, 1997; WIMO et al., 1992), devido à dependência do paciente e ao custo do tratamento (LUZARDO et al., 2006). Os fatores de risco associados com a doença de Alzheimer ainda não são inteiramente conhecidos. Entre eles, podemos destacar: idade, gênero, traumatismo craniano, dano genético hereditário, Síndrome de Down e baixa escolaridade (REICHMAN e CUMMINGS, 2002).

### 2.3. ASPECTO CLÍNICO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

A Doença de Alzheimer (DA) é um processo neurodegenerativo crônico, como sintomas associados a deterioração da memória, declínio intelectual e perda de outras funções cognitivas (BLENNOW et al., 2006; CUMMINGS, 2004). Geralmente, o primeiro sintoma que se observa no paciente com DA é um déficit nas memórias declarativas recentes, diferente das memórias antigas, que são preservadas até os estágios mais avançados da DA (LINDEBOOM e WEINSTEIN, 2004).

Outras funções cognitivas vão sendo perdidas à medida que a doença evolui, como por exemplo, a fluência verbal, atenção, capacidade de realizar cálculos matemáticos básicos, capacidade de manusear ferramentas e a percepção visuo-espacial (LINDEBOOM e WEINSTEIN, 2004). Esses sintomas são também acompanhados por transtornos físicos e de humor, como agressividade, alucinações, hiperatividade, irritabilidade, apatia, perda de peso, insônia, diminuição da atividade locomotora e depressão (EASTWOOD e REISBERG, 1996; REICHMAN e CUMMINGS, 2002).

O diagnóstico definitivo da DA só é possível na avaliação *post-mortem* e de acordo com a Academia Brasileira de Neurologia, o diagnóstico provável da DA deve ser baseado em exames clínicos para avaliar o estado mental, função executiva e o estado psicológico do paciente (NITRINI, R. et al., 2005). Para verificar essa gama de fatores, os especialistas se utilizam de baterias de testes capazes de diagnosticar déficits neurológicos (CHAVES, 1993; NITRINI, R. et al., 2005).

Um dos testes utilizados é o Mini Exame do Estado Mental (MEEM), elaborado por Folstein e colaboradores (1975). O MEEM é o teste de rastreio cognitivo global mais utilizado no mundo (CHAVES, 1993; LOURENÇO e VERASI, 2006). O MEEM adaptado de Folstein e colaboradores (1975) é constituído de sete estratificações, informando sobre os seguintes parâmetros cognitivos: orientação temporal, orientação espacial, memória imediata, atenção e cálculo, evocação das palavras, linguagem e capacidade construtiva visual. O escore do MEEM pode variar de um mínimo, p. ex. 0 pontos, que indica um maior grau de comprometimento cognitivo dos indivíduos, até um máximo de 30 pontos (FOLSTEIN et al., 1975).

## 2.4. ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS DA DOENÇA DE ALZHEIMER

A DA é caracterizada por seus efeitos nas sinapses e pela morte neuronal em decorrência do acúmulo de proteínas fibrilares amiloides formando placas senis e pelo envelhecimento da proteína Tau hiperfosforilada (BALLATORE et al., 2007; LAFERLA et al., 2007). Esses processos patológicos se estendem por várias regiões do encéfalo, incluindo o córtex cerebral e regiões subcorticais (figura 4), eventualmente provocando atrofia parenquimatosa, que pode ser evidenciada pela presença de sulcos e fissuras pronunciadas e o alargamento das regiões ventriculares.

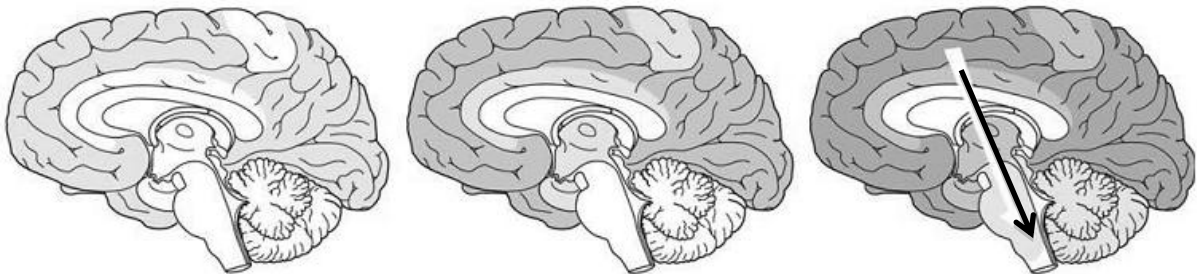


Figura 4: Visualização temporal do acúmulo da proteína beta amiloide no encéfalo, iniciando pelo córtex e seguindo para regiões subcorticais: Tons de cinza mostram o grau evolutivo da deposição da proteína Beta amiloide no encéfalo, sendo em níveis avançados a proteína adentrando o tronco encefálico indicado pela seta. Adaptado (JUCKER e WALKER, 2011).

### 2.4.1. FORMAÇÃO DA PROTEÍNA BETA AMILÓIDE

O peptídeo beta amiloide ( $\beta$ A) é encontrado em duas configurações principais, uma cadeia contendo 40 aminoácidos e outra com 42 Aminoácidos (JARRETT et al., 1993; YOUNKIN, 1998). A  $\beta$ A é o subproduto da clivagem da proteína precursora amilóide (PPA), uma macromolécula que se localiza na membrana plasmática da célula (GOATE et al., 1991). A formação da  $\beta$ A se dá por duas vias diferenciadas pela clivagem em uma região específica da proteína precursora amilóide (ALLINSON et al., 2003; VASSAR et al., 1999).

Na via não amiloidogênica (figura 5), a clivagem da PPA ocorre entre a lisina 16 e a leucina 17 pela enzima  $\alpha$  secretase. Logo em seguida ocorre liberação da porção N – terminal solúvel da PPA pela  $\gamma$  secretase (ALLINSON et al., 2003; VASSAR et al., 1999). Na outra via denominada de via amiloidogênica (figura 5) a PPA é clivada por uma enzima chamada  $\beta$  secretase, que atua nos aminoácidos aspartato 1 e glutamina 11. Essa clivagem força a liberação de uma grande parte da PPA que logo em seguida sofre a ação da  $\gamma$  secretase que

atua no fragmento carboxiterminal dentro da região hidrofóbica da membrana plasmática causando a liberação da proteína beta amilóide (VASSAR et al., 1999).

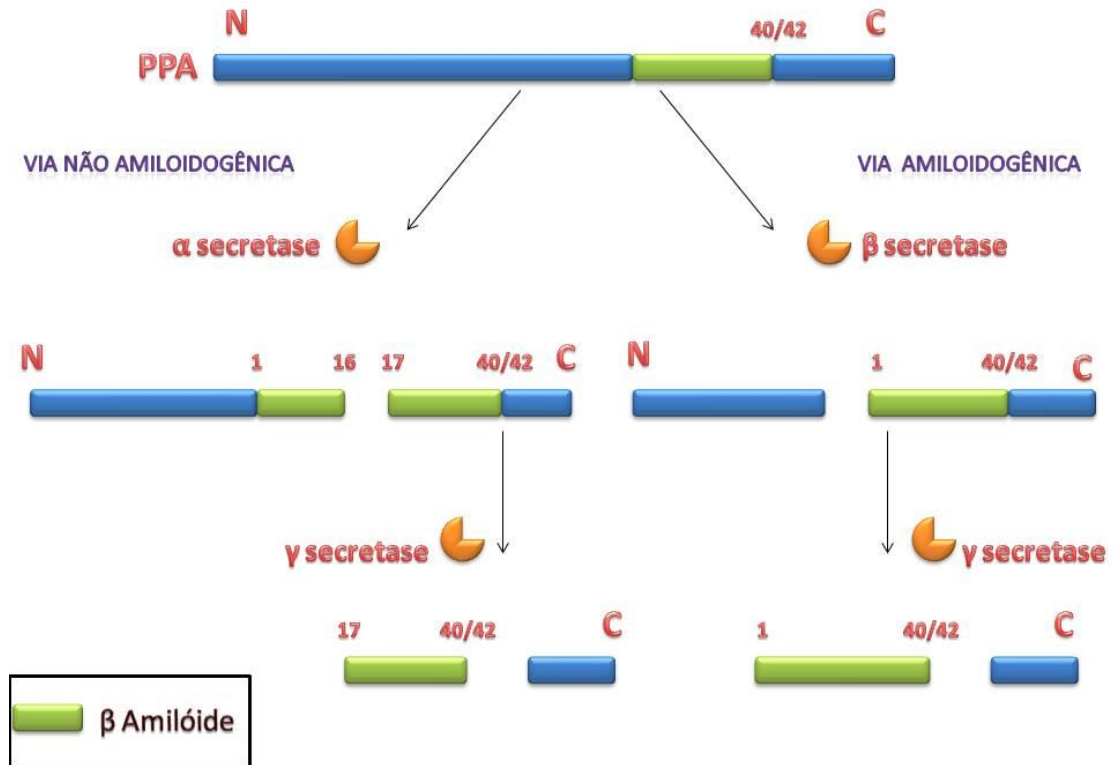


Figura 5: Proteólise da PPA. A via amiloidogênica, utilizando a enzima  $\beta$  secretase, e via não amiloidogênica, utilizando a via  $\alpha$  secretase. FONTE.

Após a formação da proteína beta amilóide os agrupamentos são gerados em vários estágios: a primeira etapa é a formação de pares denominados oligômeros. Em seguida, os oligômeros vão se agregando e formam protofibrilas e por final as fibrilas, que vão originar as placas neuríticas, como demonstrado na figura 6 (WALSH et al., 2002). As placas neuríticas formam estruturas esféricas de 50 – 200  $\mu\text{m}$  de diâmetro, compostas por um núcleo protéico com 40 a 42 aminoácidos num emaranhado periférico associado com células microgliais e astrogliais (IWATSUBO et al., 1994; MANDYBUR e CHUIRAZZI, 1990).

A  $\beta$ A também desempenha um papel tóxico no meio intracelular, onde seus vários estágios de agrupamento causam disfunções metabólicas tais como o acúmulo de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular levando a ativação de caspases e apoptose (GOMES-LEAL et al., 2004; MOUSSA et al., 2006; NAKAGAWA et al., 2000). Além disso, pode causar a produção em excesso de espécies reativas de oxigênio (EROs) que também vão resultar na degradação celular (BEHL et al., 1994; STEFANOVA et al., 2005).

Além dos eventos patológicos primários em decorrência da morte celular endógena por estresse oxidativo e degradação proteica, a  $\beta$ A também induz uma resposta inflamatória no sistema nervoso central (SNC), mediado pelas células microgliciais (TUPPO e ARIAS, 2005). As micróglia são células de defesa imunológica do SNC e patrulham o parênquima cerebral eliminando resíduos moleculares e celulares. As células microgliciais expressam o complexo principal de histocompatibilidade tipo II (MHC classe II), citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, espécies reativas de oxigênio e proteínas complemento (MOORE e O'BANION, 2002).

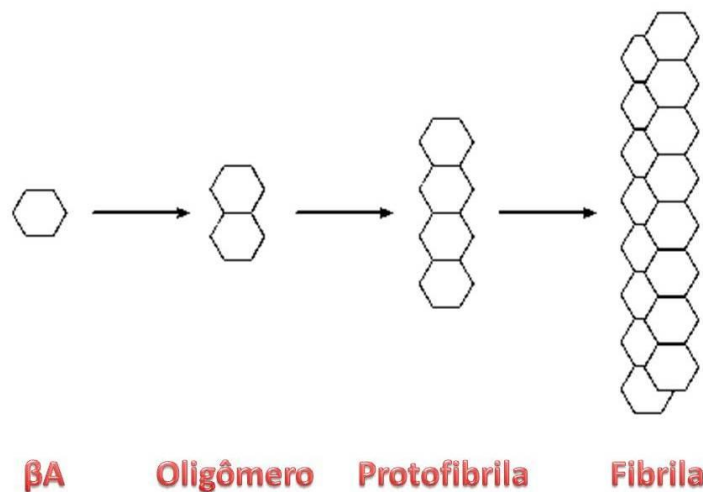


Figura 6: Os vários estágios da formação da placa neurítica. Adaptado de Laferla e colaboradores (2007).

As células microgliciais ativadas se aglomeram ao redor da placa neurítica com a finalidade de remover o excesso do polipeptídio  $\beta$ A (MOORE e O'BANION, 2002; TUPPO e ARIAS, 2005). Entretanto, a resposta inflamatória também causa destruição das células nervosas, sendo que muito desses danos são mediados por citocinas pró-inflamatórias como a interleucina 1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ). Outro tipo celular que também participa do processo patogênico é o astrócito, que é ativado pelo acúmulo de  $\beta$ A no parênquima nervoso, num processo denominado astrogliose, e forma envelopes ao redor desse aglomerado e evita que o mesmo se espalhe para regiões vizinhas (DICKSON, 1997; TUPPO e ARIAS, 2005).

## 2.4.2. FORMAÇÃO DO EMARANHADO NEUROFIBRILAR

A proteína Tau faz parte da família de proteínas ligadas aos microtúbulos, denominadas de MAPs (*microtubule associated proteins*), cuja função principal é estabilizar os microtúbulos através da agregação das tubulinas (BALLATORE et al., 2007; KIKKAWA et al., 1994). Em neurônios saudáveis, a proteína Tau está localizada principalmente no axônio. Numa situação patológica, entretanto, a Tau é encontrada por todo o corpo celular (KIKKAWA et al., 1994).

A hiperfosforilação da Tau ocorre principalmente através da ativação de três cinases: a cinase sintase de glicogênio 3 (GSK3), cinase dependente de ciclina 5 (CDK5) e a cinase reguladora da afinidade para microtúbulos (MARK). Estas cinases adicionam radicais fosfato à Tau forçando a dissociação do microtúbulo (BRUNDEN et al., 2009). As cadeias de proteína Tau vão se agregando e formando emaranhados neurofibrilares (ENFs). Com o aumento dos ENFs os microtúbulos tronam-se instáveis e levam à degeneração axonal (BALLATORE et al., 2007; MAZANETZ e FISCHER, 2007).

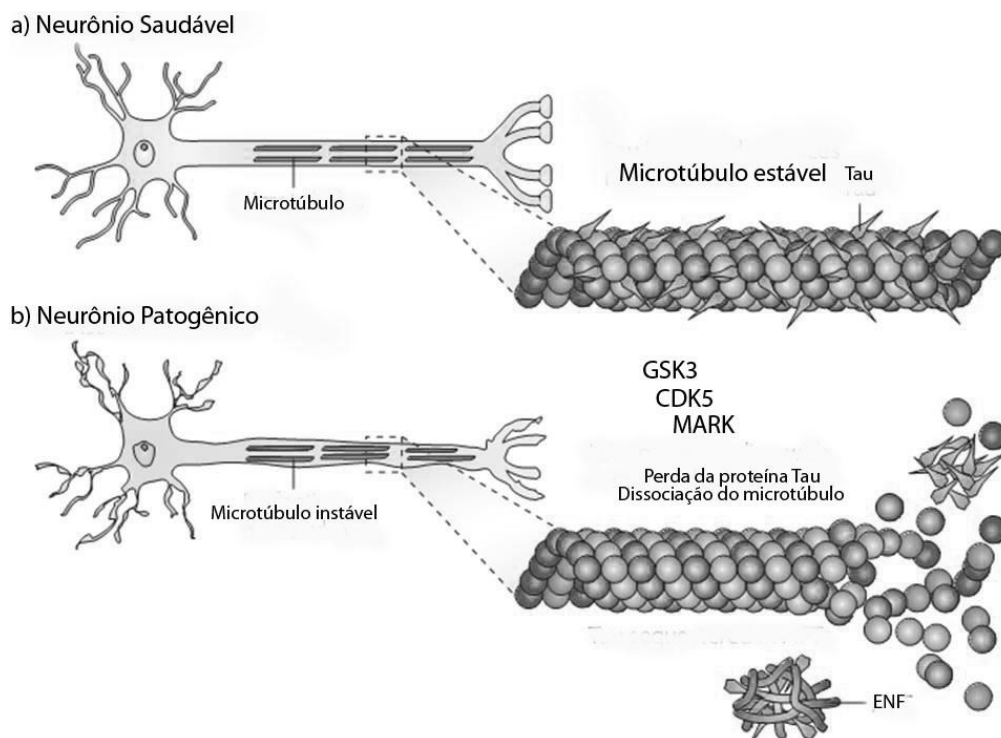


Figura 7: Desenho esquemático representando o desempenho da proteína TAU em neurônios saudáveis (a) e patológicos (b). Adaptado de Brunden e colaboradores (2009).

## 2.5. FATORES GENÉTICOS ASSOCIADOS COM A DOENÇA DE ALZHEIMER

Os primeiros estudos que revelaram a presença de um fator hereditário associado com a ocorrência da DA ocorreram em 1925, quando pesquisadores determinaram que o histórico familiar era um fator de risco para o desenvolvimento da doença (BUSFIELD e GOATE, 1995). Atualmente sabe-se que a doença de Alzheimer possui vários fatores genéticos importantes que foram descritos nas últimas décadas. Uma infinidade de genes que se encontram alterados foram identificados nesses trabalhos, alguns com frequência maior do que outros e extremamente relevantes de um ponto de vista médico pela provável associação causal com a DA (BUSFIELD e GOATE, 1995).

A DA classificada como doença de Alzheimer familiar (WALSH et al.) ocorre geralmente antes dos sessenta anos de idade, enquanto os primeiros sintomas da doença de Alzheimer esporádica (HEAD e LOTT) ocorrem depois dos sessenta e anos (BERTRAM et al., 2010). A forma esporádica da doença possui maior prevalência, com cerca de 90 – 95 % de todos os casos, como mostra a figura 8 (DUMANCHIN et al., 1998).

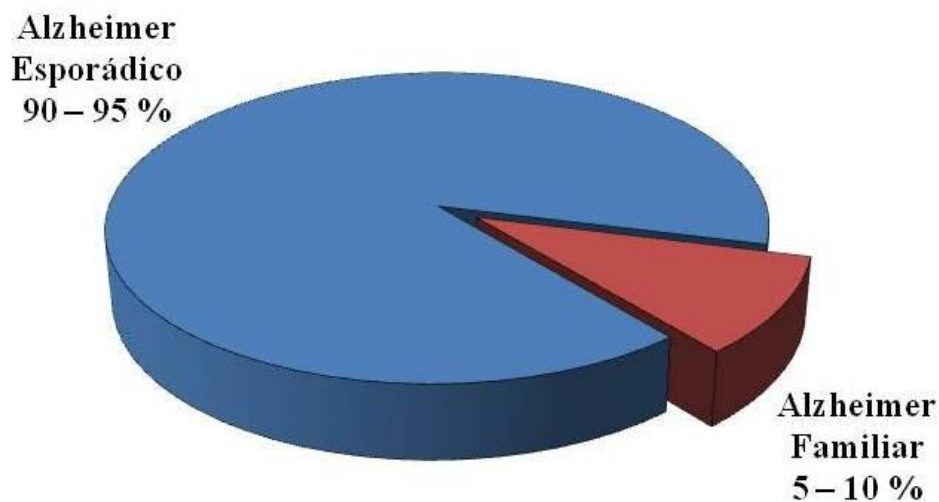


Figura 8: Índice em porcentagem da prevalência do Alzheimer. Familiar (em vermelho) e esporádico (em azul) de casos registrados da doença. Adaptado de Dumanchin e colaboradores (1998).



### 2.5.1. MUTAÇÃO NO GENE DA PROTEÍNA PRECURSORA AMILÓIDE

A proteína beta amilóide é o maior componente proteico da placa neurítica e possui uma cadeia com 39 – 42 aminoácidos (BUSFIELD e GOATE, 1995; JARRETT et al., 1993; YOUNKIN, 1998), que é formada pela proteólise da proteína precursora amilóide (PPA), uma glicoproteína transmembrana do tipo I possuindo apenas uma passagem pela membrana celular (KANG et al., 1987). A PPA é codificada pelo gene *PPA* (*Proteína Precursora Amilóide*), cujo locus gênico se encontra no cromossomo 21 (figura 9), mais especificadamente na região 21q21.3 (HEAD e LOTT, 2004).

A *PPA* possui mais de 10 isoformas e o seu gene apresenta 19 exons com cerca de 190 kilobases, sendo os éxons 16 e 17 responsáveis pela  $\beta$ A (SELKOE, 2001; SOTO et al., 1994). Estudo realizado por Johnston e colaboradores (1994), mostrou que a mutação no exon 16 faz os neurônios produzirem sete vezes mais proteína beta amiloide com 42 aminoácidos no parênquima neuronal (DICKSON, 1997). Outra característica intrigante é que os portadores da Síndrome de Down apresentam precocemente características patológicas idênticas aos dos portadores da DA, como alta produção de  $\beta$ A e perda cognitiva semelhante aos portadores de DA (BUSH e BEAIL, 2004).

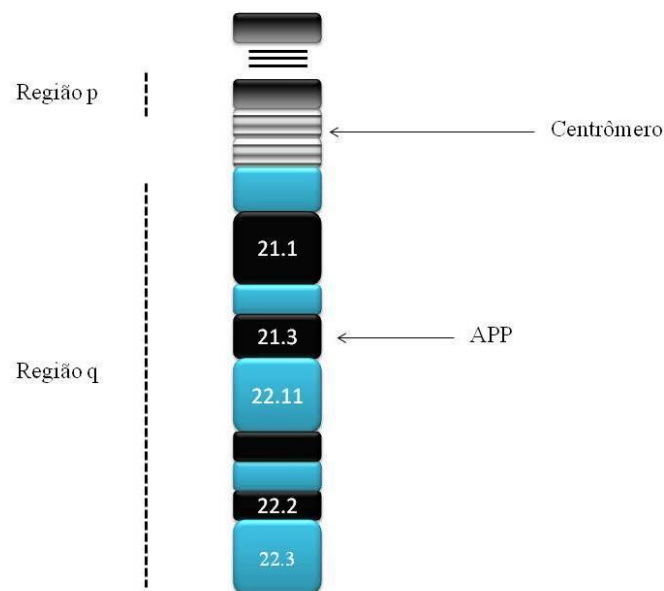


Figura 9: Desenho esquemático do Cromossomo 21. A seta indica a localização do gene da proteína precursora amilóide adaptado (ZANA et al., 2007).

### 2.5.2. MUTAÇÃO NOS GENES DAS PROTEÍNAS PSEN-1 e PSEN-2

As alterações do gene *PS-1* e *PS-2* estão entre as variações genéticas mais estudadas relacionadas com a DA. Já foram identificadas cerca de 180 tipos de mutações somente no gene *PS-1*, porém o mecanismo que causa as mutações é desconhecido (BATEMAN et al., 2001; LARNER, A. J., 2011 ). O gene *PS-1* possui 10 éxons e está localizado no cromossomo 14 (14q24.2), que codifica a proteína presenilina 1 (PSEN-1). Esta proteína possui várias funções, como a sinalização celular que auxilia na maturação e no desenvolvimento celular, além da regulação mitótica da célula (HO e SHEN, 2001; LI et al., 1997). As mutações que ocorrem no gene *PS-1* são geralmente a substituição da base nitrogenada citosina por timina, modificando o códon 170 onde o aminoácido serina é trocado pela fenilalanina (SNIDER et al., 2005). Essa mutação causa deposição maciça no cérebro de  $\beta$ -amilóide, ENFs e formação de corpos de Lewi em várias regiões do encéfalo, como o tronco encefálico, as regiões límbicas e o córtex cerebral (GOLAN et al., 2007; PICCINI et al., 2007).

Outro gene, o *PS-2* que origina a proteína presenilina 2, constituinte da enzima  $\gamma$ -secretase, possui 12 éxons localizado no cromossomo 1 (1q42.13). Diferente da proteína PSEN-1, suas mutações são raras e causam pouca influência no processo patológico (SCHELLENBERG et al., 1992).

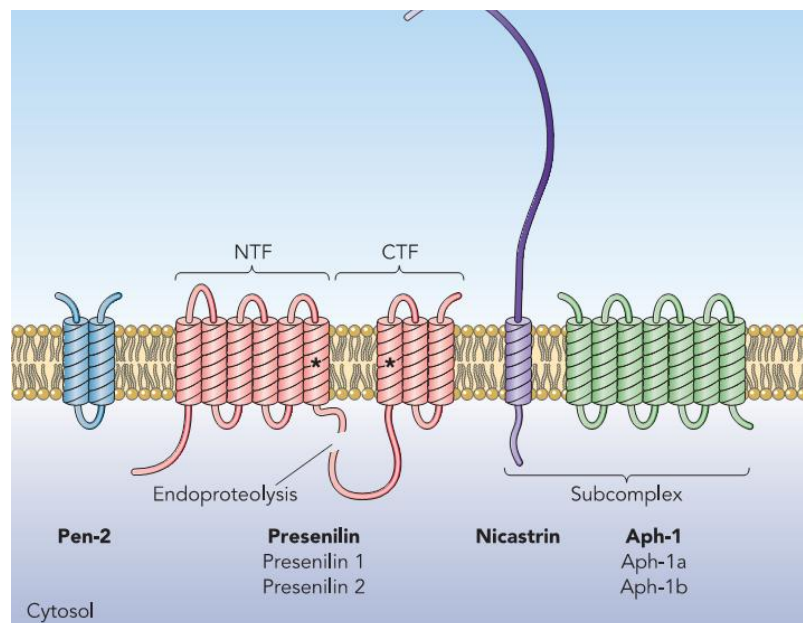


Figura 10: Complexo proteico da enzima  $\gamma$  secretase e seus constituintes (PEN-2, Presenilina 1 e 2, nicastrina e APH-1). Adaptado de (WAKABAYASHI e STROOPER, 2008)

### 2.5.3. MUTAÇÃO NO GENE DA PROTEÍNA TAU

A proteína Tau desempenha um papel importante na patogênese do DA e o seu gene, denominado *MAPT*, localiza-se no cromossomo 17 (17q21.31) e também sofre mutação, rearranjo ou até mesmo deleção em casos de DA (LLADÓ et al., 2007). Esses tipos de variações gênicas também são observadas em pessoas com atraso mental, atraso no desenvolvimento e distúrbios de aprendizagem (KOOLEN et al., 2006; LLADÓ et al., 2007).

A mutação do gene *MAPT* causa o aumento da proteína glicogênio sintetase cinase beta 3 responsável por fosforilar a proteína Tau, ocasionando degeneração da estrutura microtubular do neurônio, provocando colapso no crescimento de neuritos, transporte mediado por microtúbulos e maturação dos oligodendrócitos (ZHANG et al., 2011). Em certos casos o gene *MAPT* sofre duplicação, causando o aumento da proteína beta amilóide e da concentração proteína Tau livre (ZHANG et al., 2011).

### 2.5.4. MUTAÇÃO NO GENE DA PROTEÍNA MACROGLOBULINA ALFA 2

Outro gene que adquiriu bastante importância pelo seu provável envolvimento na gênese da DA é o *A2M*, que codifica a proteína macroglobulina alfa 2 ( $\alpha$ 2M), um receptor lipoprotéico (HOPE et al., 2003). Esse gene está localizando no cromossomo 12 (12p13.31), possuindo cerca de 48Kb com 36 éxons e tem um papel importante na regulação da proteína  $\beta$ A, removendo-a do sistema e diminuindo a formação das placas neuríticas (HOPE et al., 2003). A proteína  $\alpha$ 2M tem uma função importante durante a acumulação da  $\beta$ A no parênquima neuronal, se ligando ao peptídeo patogênico no meio extra celular (KOVACS, 2000). Após formação do complexo  $\alpha$ 2M/ $\beta$ A, o complexo reconhecido receptor denominado LRP, assim facilitando a fagocitose pela célula e sendo destruída na estrutura lisossomal (BIAN et al., 2005; KOVACS, 2000).

Estudos envolvendo o polimorfismo do gene *A2M* mostraram que alteração devido à deleção do éxon 18 pode causar uma grande aumento da proteína beta-amilóide, porém possíveis mutações nesse gene causam aparecimento da doença de Alzheimer na forma tardia (KOVACS, 2000).

### 2.5.5. MUTAÇÃO NO GENE DA APOLIPROTEÍNA E

A família de genes *ApoE* codifica a Apolipoproteína E, cujo locus gênico se encontra no cromossomo 19 (19q13.2) e possui três isoformas  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  e  $\epsilon 4$  envolvidas com a DA do tipo esporádico (ROSES, 1994; WIJSMAN et al., 2004). A apolipoproteína E é uma glicoproteína com 317 aminoácidos e está envolvida com a produção de lipídios e com o processo de regeneração neuronal, sendo os astrócitos e as micróglias os maiores produtores de Apo E no SNC (OJOPI et al., 2004). Vários estudos vêm demonstrando uma relação entre esse gene e a DA (OJOPI et al., 2004; ROSES, 1994).

A isoforma  $\epsilon 4$  possui uma grande relevância para a patogênese da DA e alguns estudos demonstram que a  $\epsilon 4$  contribui para a deposição de beta amiloide, mas o mecanismo ainda não é bem conhecido (RUBINSZTEIN et al., 1994). Dependendo da frequência do alelo que codifica a isoforma ocorre uma maior ( $\epsilon 4/\epsilon 4$ ) ou menor ( $\epsilon 3/\epsilon 4$ ) influência na doença. Alguns estudos em camundongos com tendência em formar placas neuríticas demonstraram que quando o alelo  $\epsilon 4$  é nocauteado ocorre uma diminuição significativa da quantidade de placas neuríticas (BALES et al., 1997).

A apolipoproteína E desempenha a função de limpeza dos oligômeros de beta amiloide. As duas moléculas possuem uma elevada afinidade: a Apo E se liga na  $\beta A$ , fazendo a mediação entre a proteína patogênica e o receptor LDL, que vai auxiliar na fagocitose da  $\beta A$  e sua destruição na estrutura lisossômica. Quando a isoforma  $\epsilon 4$  é expressa no indivíduo, esse mecanismo neuroprotetor falha, ocasionando o aumento de placas neuríticas (KIM et al., 2009).

### 2.6. CITOGENÉTICA DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Os cromossomos podem sofrer variações estruturais ou numéricas que podem resultar no surgimento de doenças (BAJIC et al., 2009). Existem três grandes técnicas para estudar as variações genômicas: citogenética, citogenética molecular e a genética molecular (BAJIC et al., 2009). A citogenética (clássica ou molecular), entretanto, vem desempenhando um papel importante no estudo de macro anomalias do genoma.

A primeira sugestão da relação entre o número de cromossomos e a doença de Alzheimer surgiu da observação de pacientes com síndrome de Down (SD). Na SD os portadores da doença possuem três cópias do cromossomo 21 (trissomia) e a expressão da *PPA* é potencialmente maior do que em indivíduos que são diplóides (ROYSTON et al.,

1999). Por volta da quarta década de vida, a expressão de proteína precursora amiloide é 50% em indivíduos com SD é maior que em portadores de DA (GELLER e POTTER, 1999).

Indivíduos considerados normais também podem apresentar sintomas semelhantes à DA pela ocorrência da trissomia do cromossomo 21 (GELLER e POTTER, 1999). Essa característica é devido ao processo de mosaïcismo, quando temos a presença de dois ou mais cariótipos diferentes em um mesmo indivíduo ou linhagem celular (figura 11). A frequência do mosaïcismo pode estar também associada com a DA, através dos efeitos na produção da proteína precursora amiloide (POTTER, 1991).

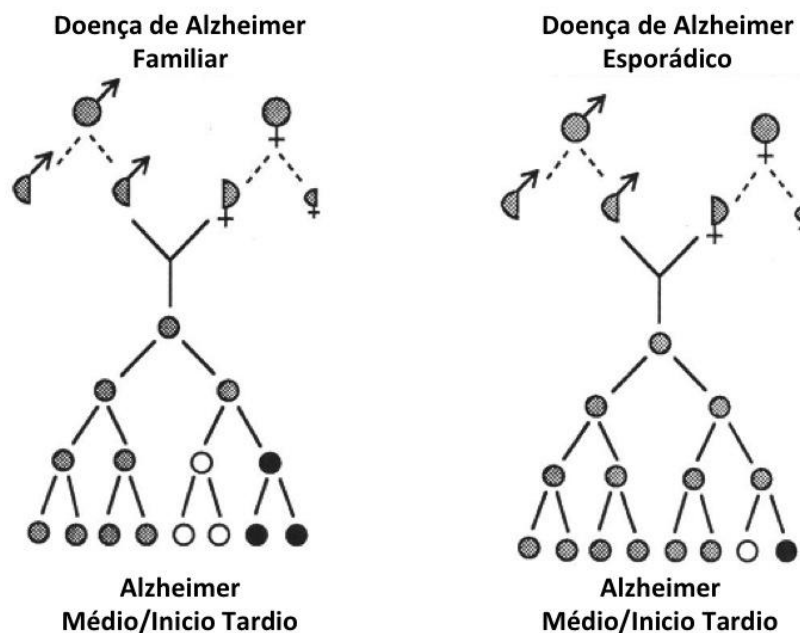


Figura 11: Diagrama esquemático do modelo baseado na disjunção cromossômica tipo síndrome de Down (trissomia do 21). Note que pacientes DA apresentam mosaïcismo médio e leve na divisão mitótica. Adaptado de (POTTER, 1991).

A presenilina 1, outra proteína ligada à DA, também desempenha um papel na regulação mitótica, influenciando na segregação cromossômica (BOERAS et al., 2008). Alguns estudos vêm demonstrando que as pessoas com a DA e que apresentam mutações nos genes *PS-1* possuem mosaïcismo cromossômico decorrente de modificações no eixo funcional e estrutural mitótico (BOERAS et al., 2008). Outro evento associado com a demência é a divisão precoce do centrômero ou DPC (NORDENSON et al., 1980; ŽIVKOVIĆ et al., 2006). A DPC (Figura 12) é um fenômeno de perda do controle sobre a separação sequencial e a segregação dos centrômeros do cromossomo, caracterizada pela separação distinta das cromátides mais cedo do que o normal, causando desequilíbrio cromossômico (FITZGERALD et al., 1986; MEHES e BUHLER, 1995). A frequência de

mosaicismo cromossômico ligado à demência ainda é pouco compreendido, assim como a frequência de duplicação e/ou deleção individual de cada cromossomo ligado à DA ou a manutenção da mesma.

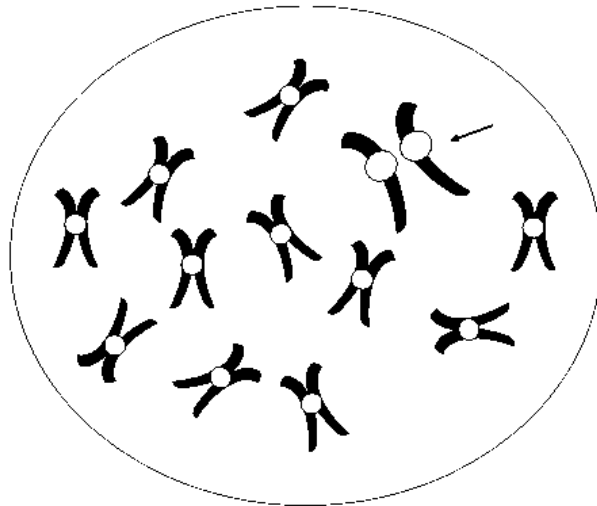


Figura 12: Desenho esquemático da divisão precoce do centrômero ocasionando a instabilidade cromossômica. Seta mostra o cromossomo com suas cromátides separadas apresentando dois centrômeros. Adaptado de (BAJIC et al., 2009)

Neste trabalho, propomos uma avaliação da frequência específica das alterações de aneuploidia dos principais cromossomos que contém genes ligados á DA (1, 14 e 21) em mulheres com sinais de demência indicativos de DA. A partir da correlação das eventuais alterações cromossômicas encontradas com o grau de disfunção cognitiva dos pacientes discutiremos a possibilidade de utilizar o padrão de alterações cromossômicas como um possível biomarcador da DA.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Verificar o potencial da análise cariotípica de linfócitos do sangue periférico como biomarcador para a doença de Alzheimer.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar a frequência de monossomia e trissomia em linfócitos periféricos de mulheres com diagnóstico de Alzheimer;
- Avaliar a correlação entre a frequência de alteração cromossômica e o desempenho cognitivo em possíveis portadores da doença de Alzheimer
- Identificar parcialmente os cromossomos com maior frequência de deleção ou duplicação em possíveis portadores da doença de Alzheimer.

#### 4. MATERIAIS E MÉTODOS

##### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

No presente estudo, foi selecionada uma amostra de dez mulheres com diagnóstico tentativo de DA acompanhadas pelo Departamento de Geriatria do Hospital Universitário João Barros Barreto (Município de Belém) para comporem o grupo experimental e dez sem sinais evidentes da DA para compor o grupo controle. Todos os participantes possuíam idade igual ou superior a 65 anos (Figura 13; Tabela 1). O desenho experimental foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa com Seres Humanos da UFPA (PROTOCOLO nº1701/05). Os critérios de inclusão e exclusão estão demonstrados na Tabela 1.

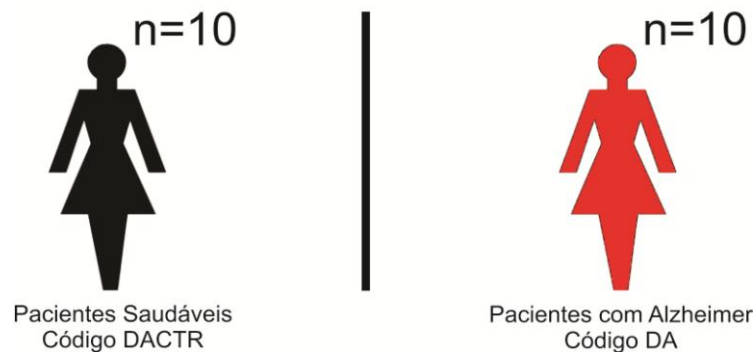


Figura 13: Desenho esquemático do desenho experimental e número amostral.

Tabela 1: Critérios de inclusão e exclusão estabelecidos na pesquisa.

<b>Critério de Inclusão</b>	<b>Critério de Exclusão</b>
<b>Idade <math>\geq</math> 65 anos</b>	<b>Idade <math>&lt;</math>65 anos</b>
<b>Grupo DA: Diagnóstico sugestivo de demência do tipo Alzheimer através de avaliação médica</b>	<b>Quadro de hipertensão</b>
<b>Grupo controle: Possuir funções cognitivas consideradas saudáveis.</b>	<b>Histórico familiar de demência vascular ou do tipo Alzheimer</b>



## 4.2 AVALIAÇÃO COGNITIVA DOS PACIENTES E QUESTIONÁRIO SÓCIO ECONÔMICO

Todos os participantes responderam um questionário sócio econômico para proporcionar uma melhor caracterização do grupo amostral, incluindo escolaridade, idade, raça, quantidade de filhos, consumo de álcool e tabaco, entre outros (Anexo 1). Para verificar o estado cognitivo dos participantes utilizamos o Mini Exame do Estado Mental (MEEM) adaptado, onde são avaliadas funções como: orientação temporal e espacial, memória imediata, atenção e cálculo, evocação das palavras e linguagem, totalizando 30 pontos (FOLSTEIN et al., 1975).

## 4.3. COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Foram coletados de cada paciente de 2 a 5 mL de sangue venoso periférico por punção, utilizando seringa previamente heparinizada em fluxo laminar (Liquemine, Roche). Em seguida, as amostras coletadas foram acondicionadas em caixas térmicas com temperatura em torno de 4 °C e transportadas para o Laboratório de Citogenética da Universidade Federal do Pará (UFPA), onde foram semeadas em frascos de cultura.

## 4.4 CULTURA DE LINFÓCITOS

Para obtenção de cromossomos metafásicos nós utilizamos a técnica de cultura temporária de linfócitos com o auxílio do meio de cultura de linfócitos humanos (Cultilab). Os frascos foram fechados, agitados e colocados em estufa a 37°C durante 72 horas. Após 71 horas de cultivo foram acrescentados 0,20 mL de colchicina  $10^{-6}$ M e, por fim, os frascos foram agitados e levados novamente à estufa até completar as 72 horas. Completado este tempo, os frascos foram retirados da estufa e agitados suavemente para desprender as células aderidas ao fundo. Em seguida, o material biológico foi transferido para um tubo falcon e submetido à centrifugação (1000 / 2000 r.p.m.) por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e adicionamos 6 mL de solução de Cloreto de Potássio (KCl) 0,075 M, previamente à 37°C.

O material foi então resuspendido e deixado na estufa à temperatura de 37°C, por aproximadamente 25 minutos. Após este tempo, foram colocados 1-3 mL de fixador Carnoy

(metanol + ácido acético, na proporção 3:1), a fim de parar a ação da solução hipotônica. Em seguida o material foi novamente centrifugado por 10 minutos e o sobrenadante despregado.

Após a centrifugação, foram colocados 5 mL de fixador Carnoy recém-preparado, o material foi resuspendido e centrifugado por 7 minutos, trocando-se fixador por mais três vezes, seguido do condicionamento no *freezer* permanecendo *overnight* (Figura 14).

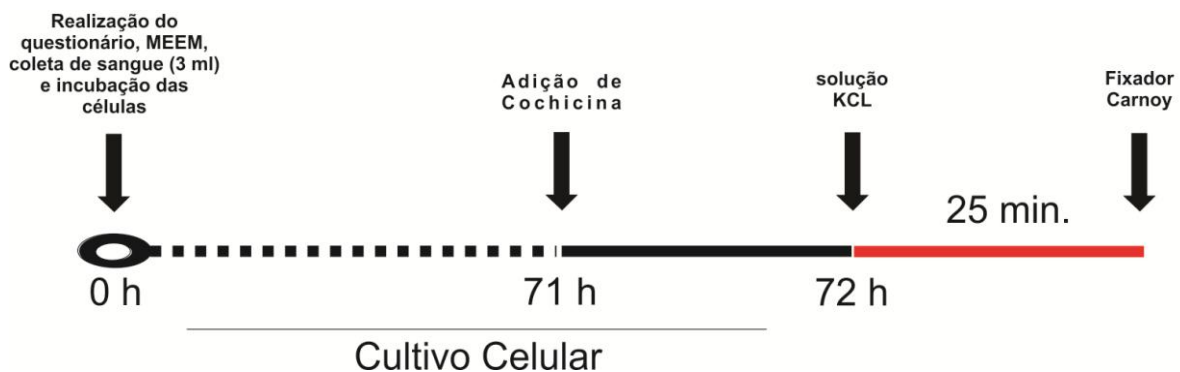


Figura 14: Desenho experimental. O tempo zero representa o momento em que se aplicou o questionário socioeconômico, o teste do MEEM modificado e realizamos a coleta de material biológico. Cultura do material biológico por 72 horas e todos os procedimentos para preparação metafásicas.

#### 4.5. PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS

As lâminas foram rigorosamente limpas com detergente neutro e receberam dois banhos com água destilada \ antes de serem usadas. Após o procedimento de limpeza, as lâminas foram acondicionadas em recipientes de plástico contendo metanol + ácido acético, na proporção 5:1 e mantidas em temperatura de 4°C. Antes da utilização das lâminas, as mesmas foram postas em solução contendo etanol e éter etílico na proporção de 1:1 para limpeza final, com secagem em temperatura ambiente. Então, foi pingado um volume de 20 µL de material previamente resuspendido e as lâminas foram deixadas secando na temperatura ambiente.

Em seguida, as lâminas foram envelhecidas em estufa a 37°C por pelo menos três dias para em seguida serem analisadas e posteriormente submetidas a bandeamentos cromossômicos.

## 4.6. TÉCNICAS DE CITOGENÉTICA CLÁSSICA

### 4.6.1. COLORAÇÃO CONVENCIONAL

Para análise e identificação dos cromossomos, as lâminas foram submetidas à coloração com corante Giemsa, diluído em tampão fosfato (0,2M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  + 0,2M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), pH 6,8, na proporção de 1:30, respectivamente, durante 7 minutos. Passado esse tempo as lâminas foram lavadas com água destilada e secadas em temperatura ambiente (Figura 15).

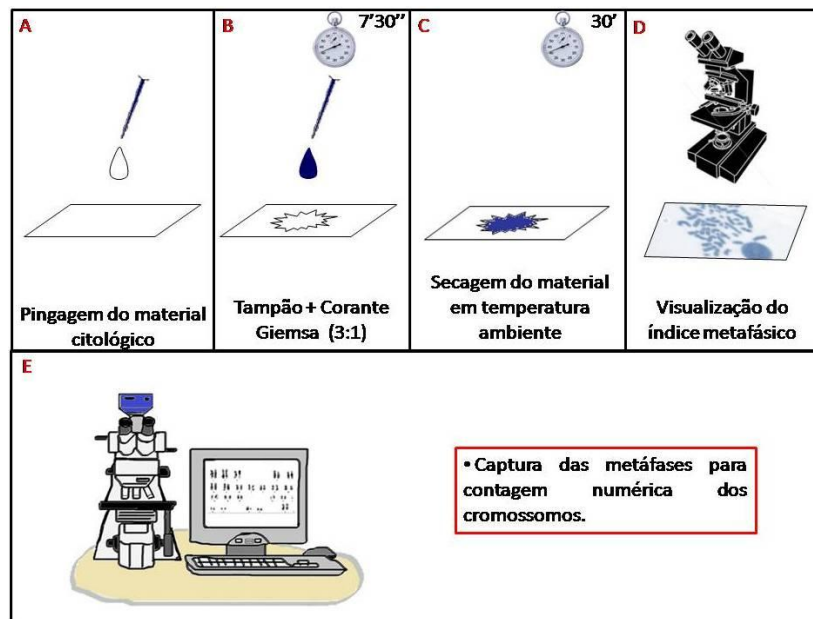


Figura 15: Desenho esquemático do procedimento de coloração convencional por Giemsa e de captura das metáfases. Adaptado de (AMARAL et al., 2008).

### 4.6.2. BANDEAMENTO CROMOSSÔMICO

#### 4.6.2.1. BANDEAMENTO CROMOSSÔMICO G

O bandejamento G foi realizado para obter uma melhor identificação cromossômica. Com o auxílio de uma pinça, as lâminas com preparações citológicas foram colocados por 1 minuto e 10 segundos dentro de uma solução 2xSSC (0,3 M  $\text{NaCl}$  + 0,03 M  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) aquecida em banho Maria à 60 °C. Em seguida foram retiradas e lavadas rapidamente com água destilada na temperatura ambiente e postas para secar em estufa a 60°C.

As lâminas foram coradas com solução de Wright (0,125 g de diluído em 50 mL de Metanol) em tampão fosfato (pH 6,8) na proporção 3:1, durante 2 minutos e 30 segundos.

Após esse tempo as lâminas foram lavadas com água destilada, postas para secar a temperatura ambiente e analisadas em microscópio óptico (Figura 16).

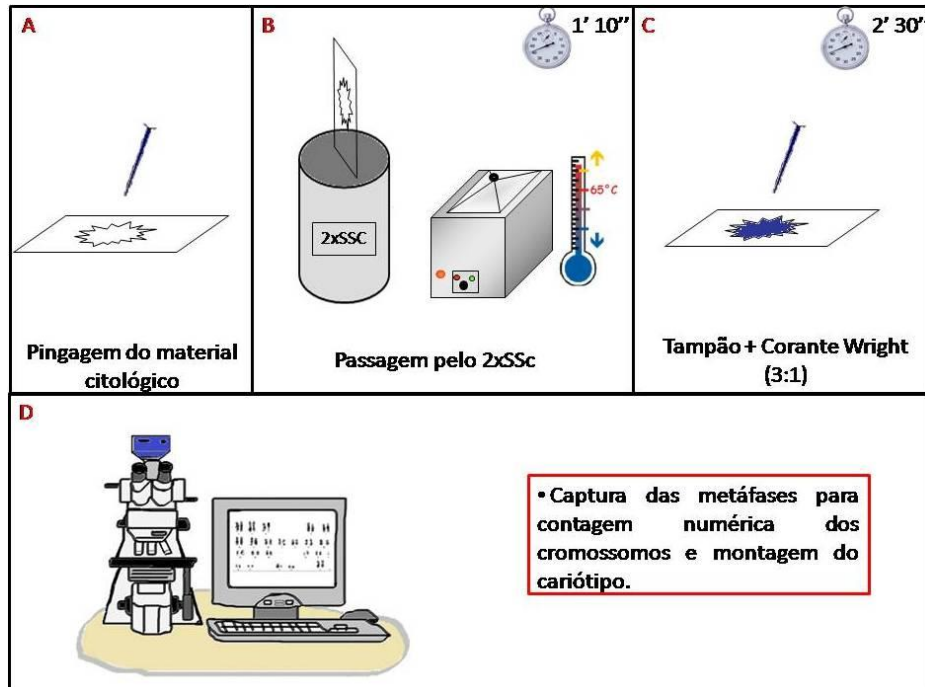


Figura 16: Desenho esquemático do procedimento de bandeamento cromossômico e de captura das metáfases. Adaptado de (AMARAL et al., 2008).

#### 4.6.3. OBTENÇÃO DE DADOS ATRAVÉS DA COLORAÇÃO CONVENCIONA E BANDA G

As fotomicrografias do material citológico corado pela técnica convencional e pela técnica de bandeamento G foram analisados com o auxílio do programa *Applied spectral imaging* (GENASIS), para determinação quantitativa dos cromossomas em metafásicos: com cariótipo normal (46), monossomia (45) e trissomia (47), sem discriminação específica de cromossomos ou grupo de cromossomos alterados (Figura 17).

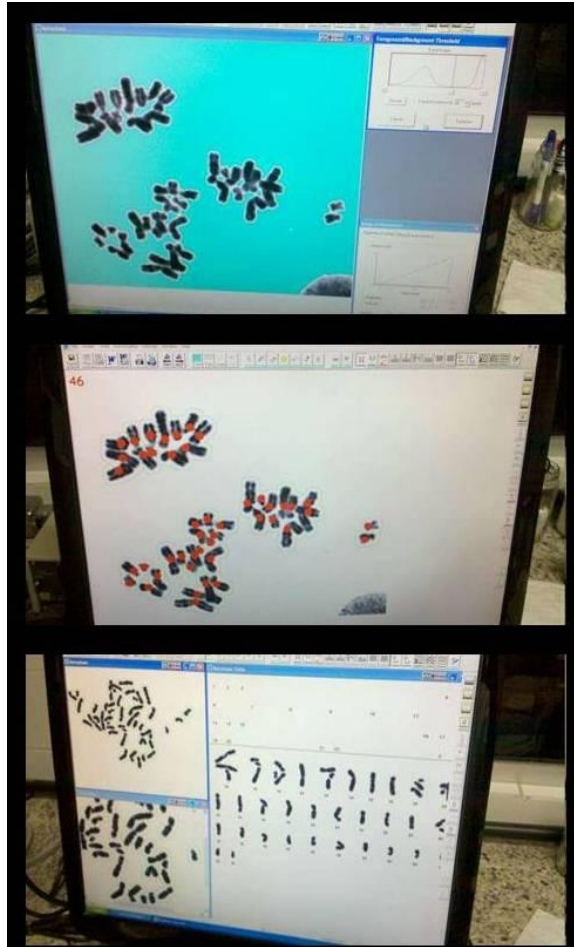


Figura 17: Fotografia demonstrando a análise quantitativa e qualitativa das metáfases coradas por meio convencional e bandeamento G.

#### 4.7. CITOGENÉTICA MOLECULAR

##### 4.7.1. HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE

A técnica de hibridização *in situ* fluorescente (VASSAR et al.) foi realizada segundo o protocolo desenvolvido no Departamento de Medicina Veterinária da Universidade de Cambridge. Realizamos a técnica de FISH na cultura de linfócitos de amostras de sangue de quatro pacientes DA e quatro pacientes controle selecionados de modo aleatório. Os cromossomos hibridizados foram o cromossomo 1, o cromossomo 14, e o cromossomo 21 (Figura 18).

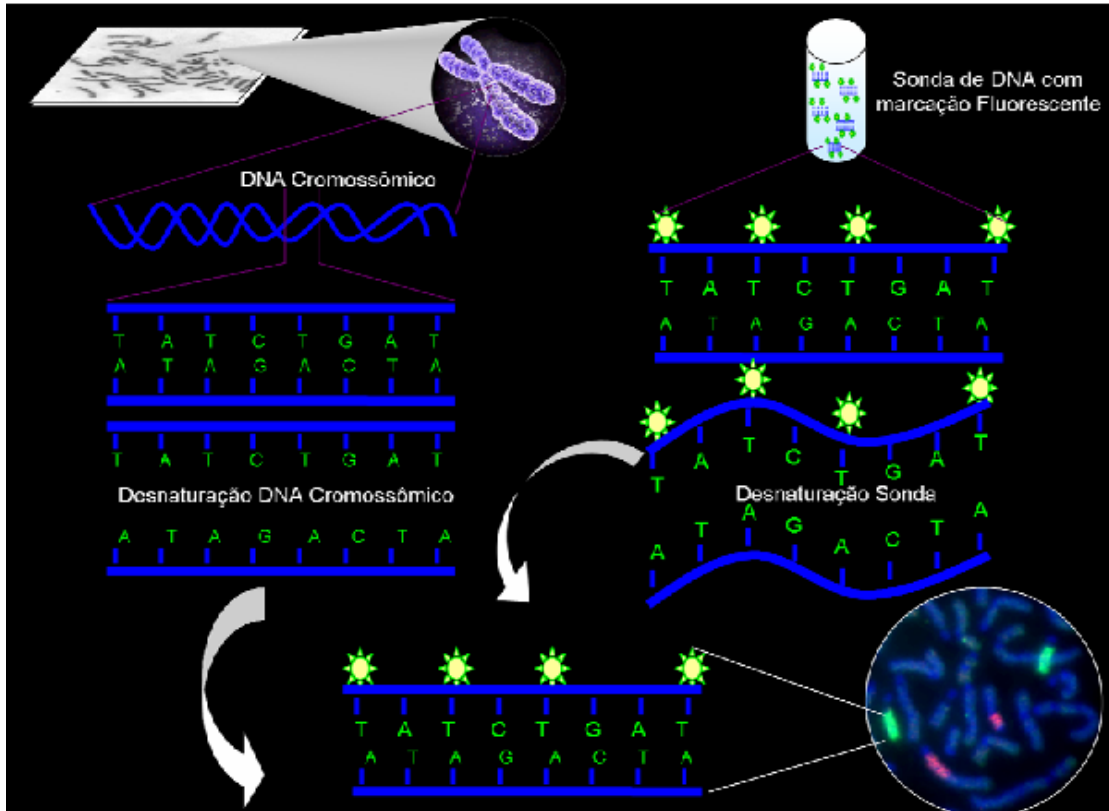


Figura 18: Principais etapas da hibridização *in situ* fluorescente.

#### 4.7.1.2. PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS

Em função da técnica de hibridização *in situ* (HIS) ser um procedimento relativamente longo e dispendioso é necessário que as lâminas estejam bem lavadas, sem resquícios de oxidação e, principalmente, com um bom índice metafásico. Para controlar a qualidade das lâminas, antes de serem utilizadas na HIS elas foram analisadas em microscopia de contraste de fase. Após a escolha das lâminas, estas foram mergulhadas em uma solução de pepsina, por 2 a 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas 3 vezes em solução de 2xSSC por 1 minuto em cada solução.

Após a pepsinização, as lâminas foram desidratadas em uma bateria de cinco concentrações crescentes de etanol (2x 70%, 2x 90% e 1x 100%; 2 minutos em cada, com exceção do último que ficou 4 minutos) e na sequência foram mantidas a 60 °C por uma hora e meia.

#### 4.7.1.3. DESNATURAÇÃO DAS SONDAS

Para a desnaturação das sondas foram realizadas as seguintes etapas: Inicialmente, foram colocados em banho-maria 37 °C por 30 minutos a alíquota com a sonda alvo e o tampão de hibridização. Após este tempo as alíquotas foram agitadas e centrifugadas em vortex e em seguida foi preparado o mix de hibridização, em um *eppendorf* contendo 13 µL de tampão de hibridização e 2 µL de sonda. A preparação final do mix ficou 10 minutos em banho-maria a 70°C.

#### 4.7.1.4. DESNATURAÇÃO DO DNA CROMOSSÔMICO

Para a desnaturação do DNA cromossômico foram realizadas as seguintes etapas: A lâminas foram retiradas da estufa 60 °C para serem incubadas em solução de formamida 70%, 65°C, por 1 minuto e meio. Em seguida, as lâminas foram imediatamente mergulhada em etanol gelado 70%, por 4 minutos, seguido da série de etanóis mantido em temperatura ambiente (1x 70% por 2 minutos , 2x 90% por 2 minutos cada e 1x 100% por 4 minutos).

#### 4.7.1.5. HIBRIDIZAÇÃO

Após as etapas de desnaturação, seguiram-se as etapas de hibridização: 15 µL de mix foram coletados do *eppendorf* e postos sobre a lâmina. Na sequência, as lâminas foram cobertas com uma lamínula limpa e lacrada com cola de tubo PVC semiflexível (Cola Vinil – Brascola), as lâminas foram deixada em uma caixa de metal e mantidas em banho-maria por 72 horas, a 37°C, ou mantida em câmara escura em estufa a 37 °C, durante o mesmo período.

#### 4.7.1.6. LAVAGENS DE ESTRINGÊNCIA

Tecnicamente, o nível de estringência indica a percentagem mínima de nucleotídeos corretamente pareados entre a sonda e o DNA-alvo. O nível mínimo de estringência é necessário para manter a estabilidade da molécula híbrida, eliminando as marcações inespecíficas. O processo de lavagem da lâmina foi realizado da seguinte maneira: o selante e a lamínula foram removidos e em seguida mergulhados duas vezes em solução de formamida 50% a 40 °C por 5 minutos. Decorridos os dez minutos, as lâminas foram mergulhada duas vezes na solução de 2xSSC, pelo mesmo período e temperatura da solução anterior. Em

seguida, as lâminas foram incubada em uma solução de Tween 20%/ 4xSSC, à temperatura ambiente, por 4 minutos.

#### 4.7.1.7. DETECÇÃO DOS SINAIS DE HIBRIDIZAÇÃO

Os sistemas de marcação e detecção utilizados no presente trabalho foram escolhidos de acordo com o tipo de experimento executado (simples ou multicolor) e de acordo com o tipo de marcação da sonda (marcação direta ou indireta). Independente do tipo de experimento, ou do tipo de marcação da sonda, foi utilizado uma solução corante de DAPI (4'6- Diamino-2-Fenil-Indol) que tem afinidade por sequências de DNA ricas em AT, o que resulta em um padrão de bandas semelhante ao produzido por bandeamento G, permitindo a identificação dos pares cromossômicos. Além disso, a coloração com DAPI funciona como contra-corante, revelando nitidamente a morfologia cromossômica (Tabela 1).

Tabela 1: Sondas utilizadas e seus fluorocromos específicos

SONDA	FLUOROCROMO/COR	MARCAÇÃO
Cromossomo 1	FITC/verde	Direta
Cromossomo 14	Cy3-Avidina/vermelho	Indireta
Cromossomo 21	FITC/verde	Direta
Cromossomo 21	Degoxigenina/Verde	Indireta



## 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

### 4.8.1. QUANTIFICAÇÃO DA ALTERAÇÃO CROMOSSÔMICA

Os resultados obtidos estão representados através dos valores de média  $\pm$  desvio padrão da média. Utilizamos o *TEST t de Student*, seguido do pós-teste *Mann-Whitney* para comparação entre os grupos e o nível de significância foi considerado  $\alpha = 0,05$ .

### 4.8.2. ANÁLISE DE CORRELAÇÃO

Realizamos a análise de correlação Pearson entre as variáveis: alteração cromossômica (monossomia e trissomia), teste de desempenho cognitivo (MEEM) e idade para verificar possíveis associações entre a doença de Alzheimer e o perfil cromossômico dos pacientes.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. CARACTERIZAÇÃO AMOSTRAL E TESTE DE RASTREIO COGNITIVO

Os indivíduos de ambos os grupos responderam o questionário socioeconômico e possuíam idade média semelhante (DA  $81,9 \pm 4,7$ ; CTR  $79,4 \pm 9,5$ ) (ver Tabela 2). A distribuição das raças é heterogênea nos dois grupos. As médias de filhos gerados pelas mulheres dos dois grupos também são semelhantes, sendo que o grupo DA tinha uma frequência maior de ocorrência de casos de aborto do que o grupo controle. A maioria da população amostral é oriunda do interior do estado e o nível de escolaridade predominante é o ensino infantil completo. Com relação ao estilo de vida, o consumo de bebida alcoólica é proporcionalmente igual entre os dois grupos e o consumo de tabaco é maior no grupo controle (ver Tabela 2).

Tabela 2: Perfil amostral dos grupos DA e CTR obtido do questionário e teste MEEM.

	DA	CTR
Idade	$81,9 \pm 4,7$	$79,4 \pm 9,5$
MEEM	$17,1 \pm 5,4$	$28,6 \pm 1,2$
<b>Raça</b>		
Branca	40%	40%
Indígena	20%	10%
Parda	30%	20%
Negra	10%	20%
Oriental	-	10%
<b>Origem</b>		
Região Metropolitana	40%	30%
Interior	60%	70%
<b>Estilo de vida</b>		
Cigarro	20%	40%
Bebida Alcoólica	40%	40%
<b>Maternidade</b>		
Filhos	$4,2 \pm 3,1$	$3,8 \pm 2,1$
Aborto	30%	20%

Números descritos em porcentagem e em média  $\pm$  desvio padrão

## 5.2. ANÁLISE DA CITOGENÉTICA CLÁSSICA E BANDEAMENTO CROMOSSÔMICO

Para verificar a frequência de alteração cromossômica utilizamos a técnica de citogenética clássica e do bandejamento G. Obtivemos uma avaliação da frequência de monossomia e trissomia nas metáfases obtidas ( $115,1 \pm 16,2$ ) através da cultura de linfócitos de todos indivíduos de ambos os grupo, ou seja, dez mulheres portadoras do mal de Alzheimer e dez mulheres saudáveis (Tabela 3).

Tabela 3: Frequência de monossomia e trissomia de cada pacientes dos grupos DA e CTRL.

Pacientes	Nº total Células	Frequência de monossomia		Frequência de Trissomia	
		Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa
DA001	146	37	25,34%	11	7,53%
DA002	108	21	19,44%	11	8,33%
DA003	144	30	20,83%	4	2,77%
DA004	104	16	15,38%	9	8,65%
DA005	104	14	13,46%	6	5,76%
DA006	100	16	16,00%	10	10,00%
DA007	117	16	13,67%	9	7,69%
DA008	135	15	11,11%	11	8,14%
DA009	115	17	14,78%	9	7,82%
DA010	102	10	9,80%	6	5,88%
CTRL001	101	8	7,92%	4	3,96%
CTRL002	107	7	6,54%	4	3,73%
CTRL003	103	10	9,70%	3	2,91%
CTRL004	103	6	5,82%	1	0,97%
CTRL005	101	5	4,95%	3	2,97%
CTRL006	145	11	7,58%	9	6,20%
CTRL007	124	10	8,06%	5	4,03%
CTRL008	128	7	5,46%	4	3,12%
CTRL009	101	5	4,95%	2	1,98%
CTRL010	114	9	7,89%	6	5,26%
Pacientes	Monossomia Global		Trissomia Global		
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
Alzheimer	15,981	4,696	7,257	2,007	
Controle	6,892	1,582	3,776	1,995	
*(p) =	< 0.0001		< 0.0015		

\*Teste estatístico usado: Test T de Student, pós – *Mann-Whitney*.

Na análise do índice de monossomia global (Tabela 3), nossos resultados demonstraram que as mulheres portadoras da DA apresentam uma taxa elevada de metáfases com quarenta e cinco cromossomos ( $15,98 \pm 4,70$ ) em comparação com os indivíduos do

grupo controle ( $6,89 \pm 1,58$ ), com uma diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,0001$ ) (Figura 19).

A análise da frequência de trissomia demonstra que as mulheres do grupo DA também possuem uma taxa elevada de alteração cromossômica ( $7.257 \pm 2.007$ ) em comparação com o grupo controle ( $3.776 \pm 1.995$ ), com uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p= 0,0015$ ) (Figura 20). A adição cromossômica (trissomia), portanto, ocorre com uma frequência aproximadamente 50% menor que a monossomia.

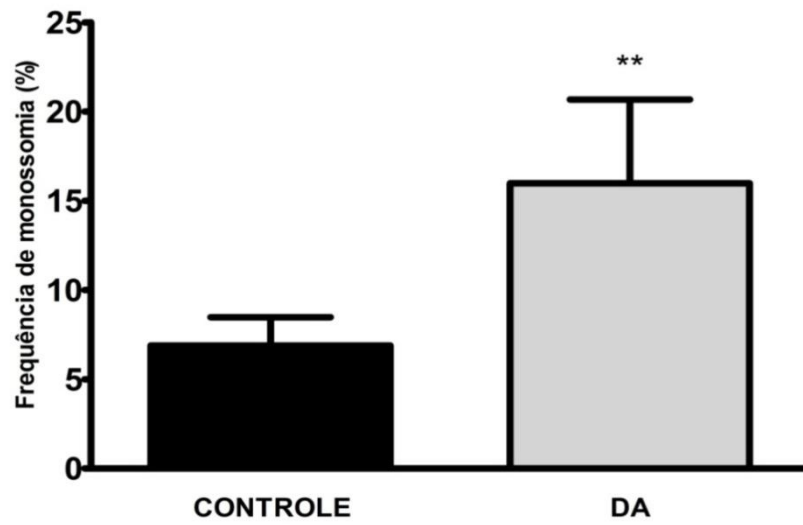


Figura 19: Frequência de monossomia do grupo controle e do grupo DA. A análise estatística demonstra que os dois grupos diferem com relação a essa variável ( $p=0,0001$  (TEST *t de Student*, seguido do pós-teste *Mann-Whitney*).

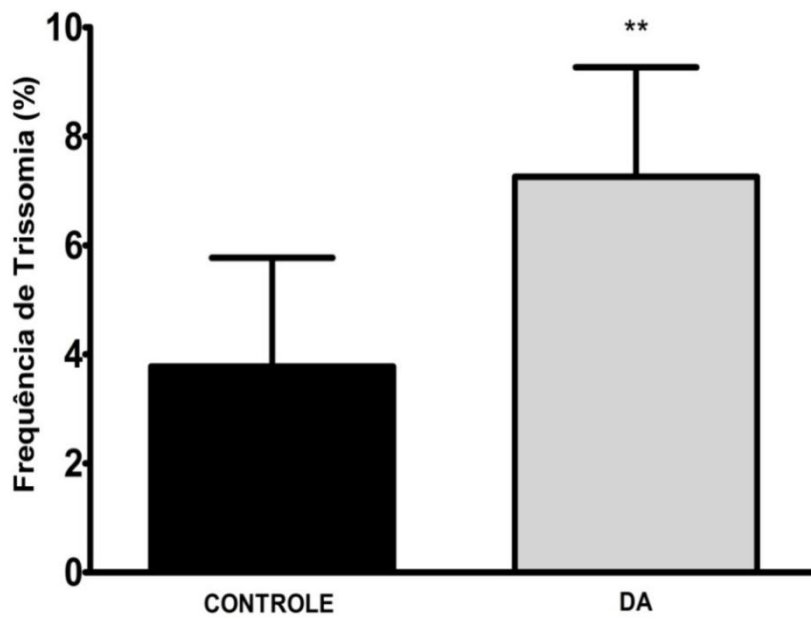


Figura 20: Frequência de trissomia do grupo saudável (controle) e do grupo DA. A análise estatística demonstra que os dois grupos diferem com relação a essa variável ( $p=0,0015$  (TEST *t de Student*, seguido do pós-teste *Mann-Whitney*).

### 5.3. CORRELAÇÃO ENTRE DESEMPENHO COGNITIVO E PERFIL CROMOSSÔMICO

A avaliação da frequência de monossomia e trissomia nos dois grupos experimentais demonstrou que as mulheres com suspeita de DA apresentam um grau elevado de mosaïcismo cromossômico. A partir dessa constatação, avaliamos a possibilidade de correlação entre os eventos cromossômicos e o desempenho cognitivo avaliado com a aplicação do teste mini exame do estado mental (MEEM), adaptado de FOLSTEIN e colaboradores (1976). O resultado do teste de correlação entre a frequência de monossomia e o *score* neurológico demonstrou uma relação negativa inversamente proporcional ( $r = -0,5260$ ) entre as variáveis, ou seja, quanto melhor é o desempenho do paciente no MEEM menor é a frequência de monossomia linfocitária (Figura 21). Entretanto, embora a correlação possa ser considerada de amplitude moderada, não há significância estatística ( $p = 0,1183$ ).

A análise de correlação entre a frequência de trissomia e o *escore* no teste MEEM dos indivíduos com suspeita de DA apresentou uma correlação negativa fraca ( $r = -0,2406$ ), (Figura 22), porém não significativa ( $p = 0,5031$ ). Esses resultados demonstram que o evento de adição cromossômica (trissomia) é menos frequente que a deleção cromossômica em pacientes com suspeita de DA e sugere que a monossomia pode ter uma maior relação com o grau de déficits cognitivo dos pacientes.

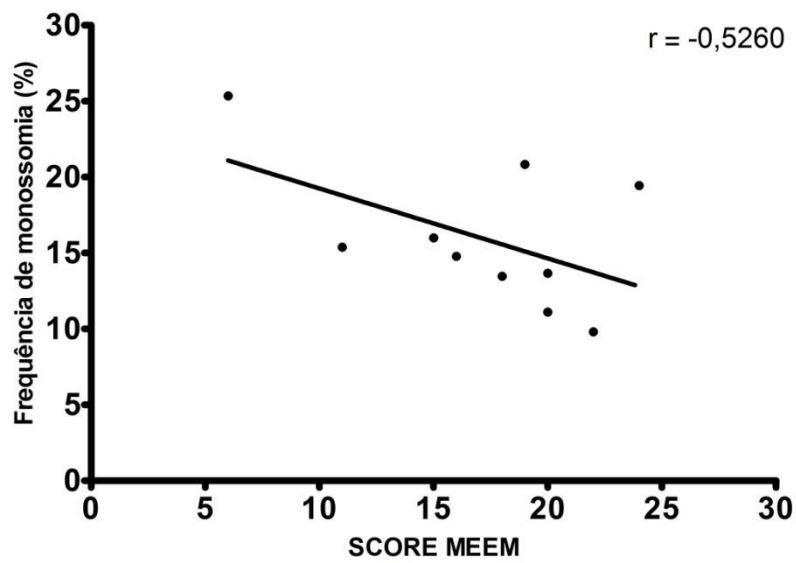


Figura 21: Correlação direta entre o score neurológico (MEEM) e a frequência de monossomia de mulheres portadoras de Alzheimer ( $r = -0,5260$ ;  $p = 0,5031$ ).

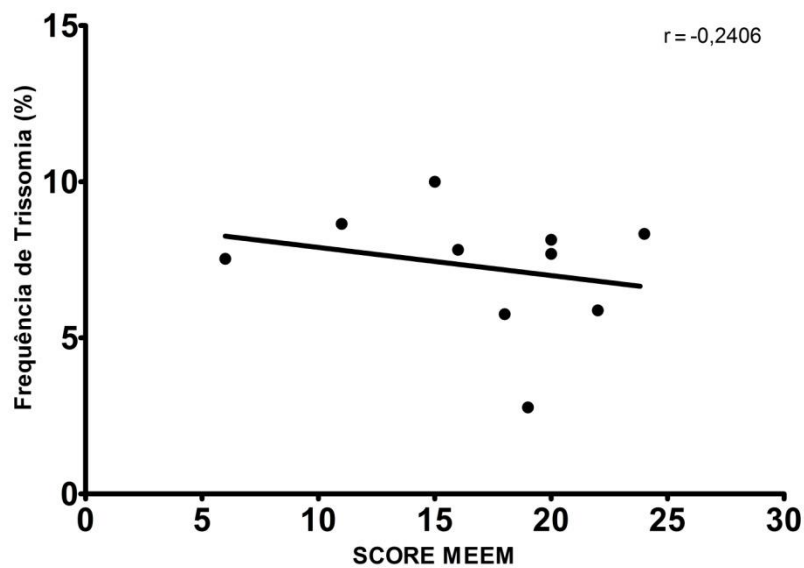


Figura 22: Correlação direta entre o score neurológico (MEEM) e a frequência de trissomia de mulheres portadoras de Alzheimer ( $r = -0,2406$ ;  $p = 0,1183$ ).

#### 5.4. ENVELHECIMENTO E A ALTERAÇÃO CROMOSSÔMICA

Realizamos o teste de correlação entre as variáveis frequência de alteração cromossômica e idade dos indivíduos controle para verificar se o nível de mosaïcismo aumenta em decorrência do envelhecimento. O teste de correlação produziu uma correlação positiva entre as duas variáveis ( $r= 0,5437$ ), porém não significativa ( $p= 0,1042$ ). Este resultado sugere que a frequência de alteração cromossômica está também relacionado com fatores ligados ao envelhecimento, mas numa frequência mais baixa que aquela dos portadores da doença (Figura 23).

O teste de correlação direta entre a frequência de trissomia e a idade dos sujeitos do grupo controle evidenciou uma associação fraca ( $r=0,0980$ ) e sem significância estatística ( $p= 0,7876$ ). Da mesma forma que no grupo DA, a monossomia ocorre com uma frequência maior que a trissomia no grupo controle (Figura 24).

A comparação da correlação entre frequência de monossomia e idade nos dois grupos (Figura 25) demonstra que o grupo de DA ( $r = -0,0452$ ) possui uma frequência maior de monossomia, porém uma correlação muito fraca ( $p= 0,9013$ ) não significativa. A Figura 25 mostra que o grupo DA difere do grupo controle, não seguindo a tendência do processo de senescência celular do grupo controle. Pode-se observar no grupo DA a presença de aglomerado de alteração celular entre 75 - 85 anos.

A mesma análise para a trissomia mostra que o grupo DA apresenta uma correlação negativa moderada ( $r= - 0,6069$ ), embora sem significância ( $p=0,0627$ ). Também é observada uma frequência maior de trissomia que no o grupo controle, que não segue a relação natural do mosaïcismo atrelado ao envelhecimento. Isso sugere que a variável que está por trás da grande frequência de monossomia e da frequência de trissomia, é provavelmente a DA e não apenas o fator envelhecimento (Figura 26).



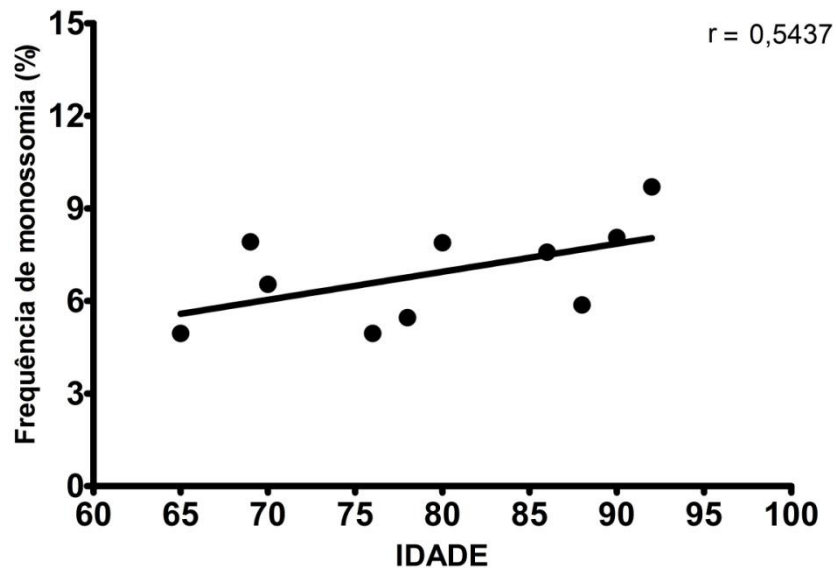


Figura 23: Correlação direta entre a frequência de monossomia das mulheres saudáveis e idade.

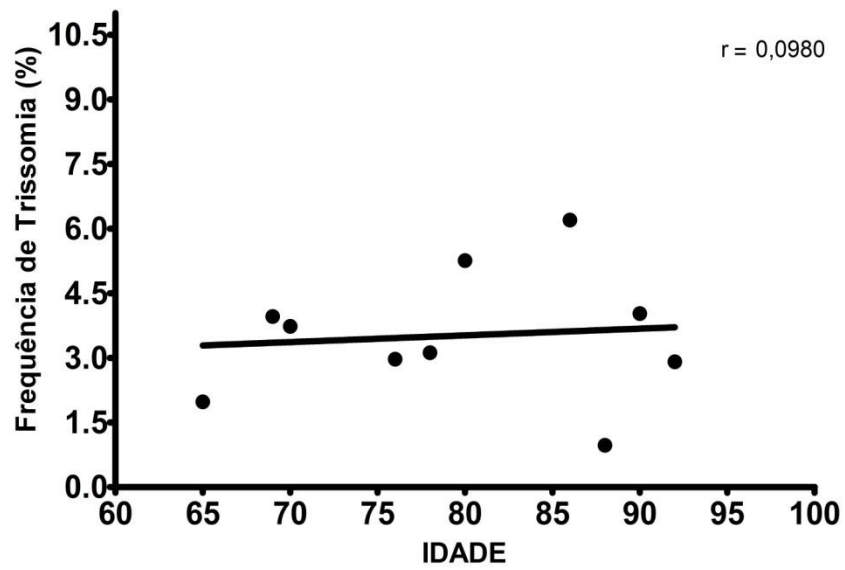


Figura 24: Correlação direta entre a frequência de trissomia das mulheres saudáveis e idade.

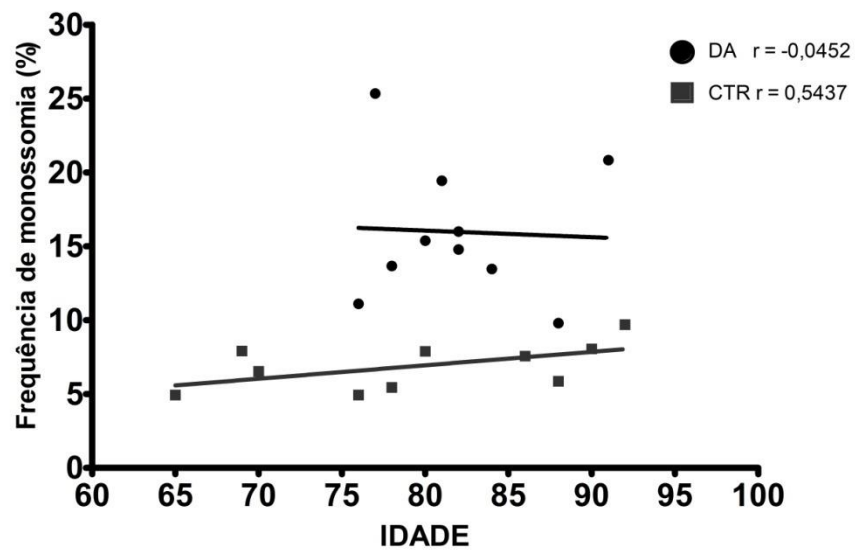


Figura 25: Correlação direta entre a frequência de monossomia de mulheres saudáveis (CTR) e portadoras da doença de Alzheimer (DA) com a idade.

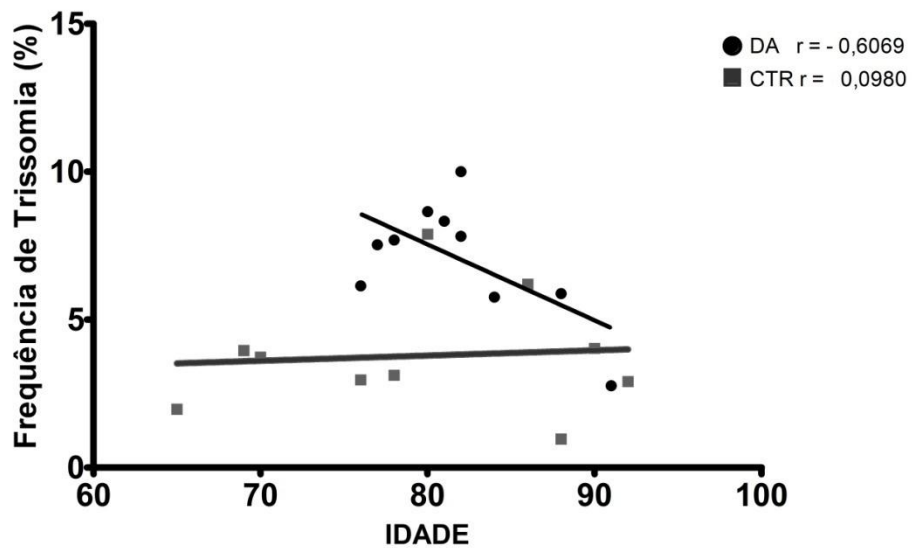


Figura 26: Correlação direta entre a frequência de trissomia de mulheres saudáveis (CTR) e portadoras da doença de Alzheimer (DA) com a idade.

## 5.5. ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DE MONOSSOMIA E TRISSOMIA EM CROMOSSOMOS QUE POSSUEM GENES ASSOCIADOS À DOENÇA DE ALZHEIMER

Utilizamos a técnica de hibridização *in situ* para averiguar as possíveis aneuploidias em cromossomos com genes relacionados com a DA. Analisamos a frequência de alterações numéricas do cromossomo 1 (Figura 26, 27, 28). Os resultados demonstram que as mulheres sugeridas com DA apresentam uma frequência maior de monossomia do cromossomo 1 ( $4,28 \pm 1,67$ ) em comparação com o grupo controle ( $0,81 \pm 0,93$ ) ( $p = 0,0294$ ). O índice de metafases contendo par de homólogos também diferiu, já que o grupo controle ( $99,19 \pm 0,93$ ) apresentou uma maior integridade numérica de seus homólogos em comparação ao grupo DA ( $95,71 \pm 1,67$ ). Não registramos nenhuma ocorrência de trissomia em relação ao cromossomo 1.

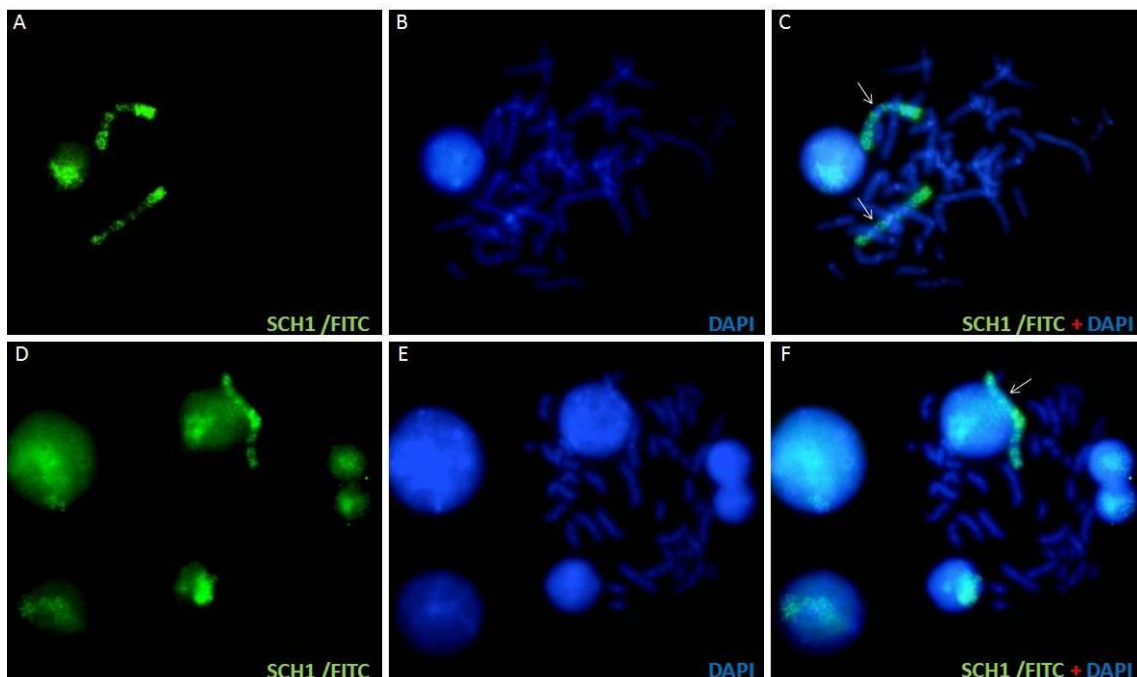


Figura 27: Hibridização *in situ* do cromossomo 1 (lócus genético da proteína presenilina 2). Imagens A, B e C representam o grupo controle e as imagens D, E e F representam o grupo Alzheimer. Sondas do cromossomo humano 1 (SCH1) marcadas com FITC (verde) e contra coradas com DAPI (azul).

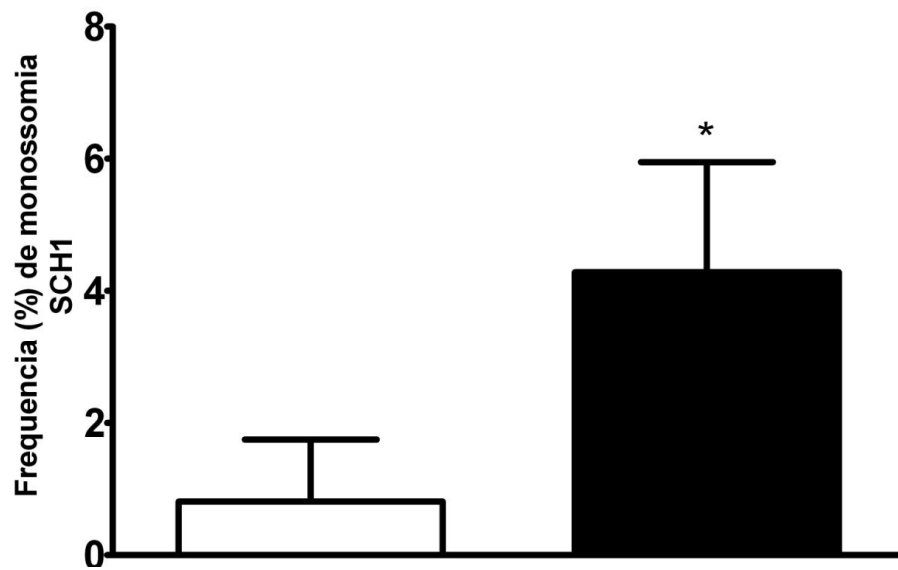


Figura 28: Frecuência relativa de monossomia do cromossomo 1 no grupo controle (CTR) e Alzheimer (DA) e a frequênciac relativa dos homólogos íntegros de ambos os grupos. com \*  $p = 0,0294$  (*TEST t de Student*, seguido do pós-teste *Mann-Whitney*).

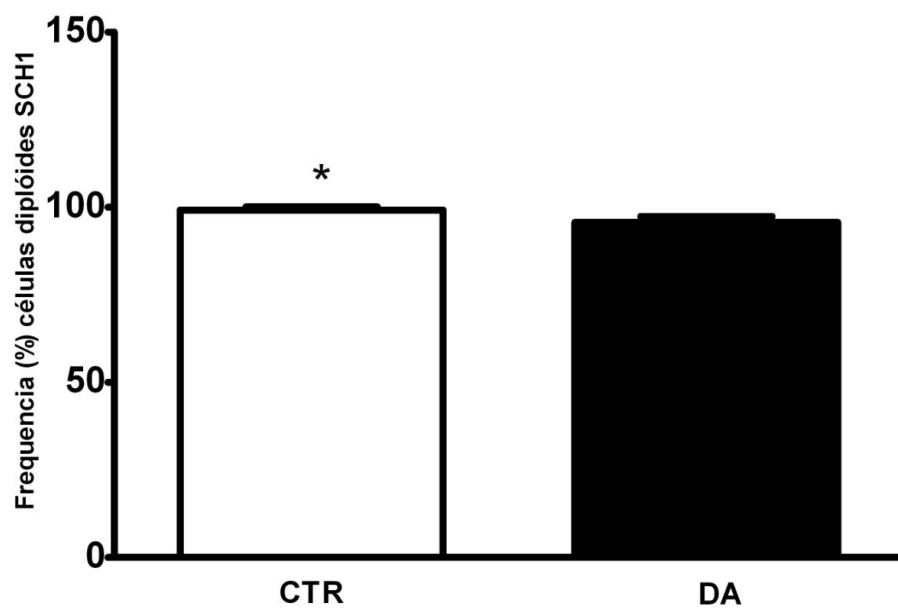


Figura 29: Frecuência relativa de diploidia do cromossomo 1 no grupo controle (CTR) e Alzheimer (DA) e a frequênciac relativa dos homólogos íntegros de ambos os grupos. com \*  $p = 0,0286$  (*TEST t de Student*, seguido do pós-teste *Mann-Whitney*).

A análise da frequência de alteração do cromossomo 14 e do cromossomo 21 (Figura 30 e 31) demonstrou que o cromossomo 21 não apresentou alteração numérica (tanto monossomia quanto trissomia). Já o cromossomo 14 apresentou uma baixa frequência de monossomia ( $3,77 \pm 0,94$ ), que se mostrou significativa ( $p= 0.0286$ ) em relação ao grupo controle ( $0,76 \pm 0,99$ ). Não houve visualização de eventos trissômicos com relação ao cromossomo 14 (Figuras 30 e 31).

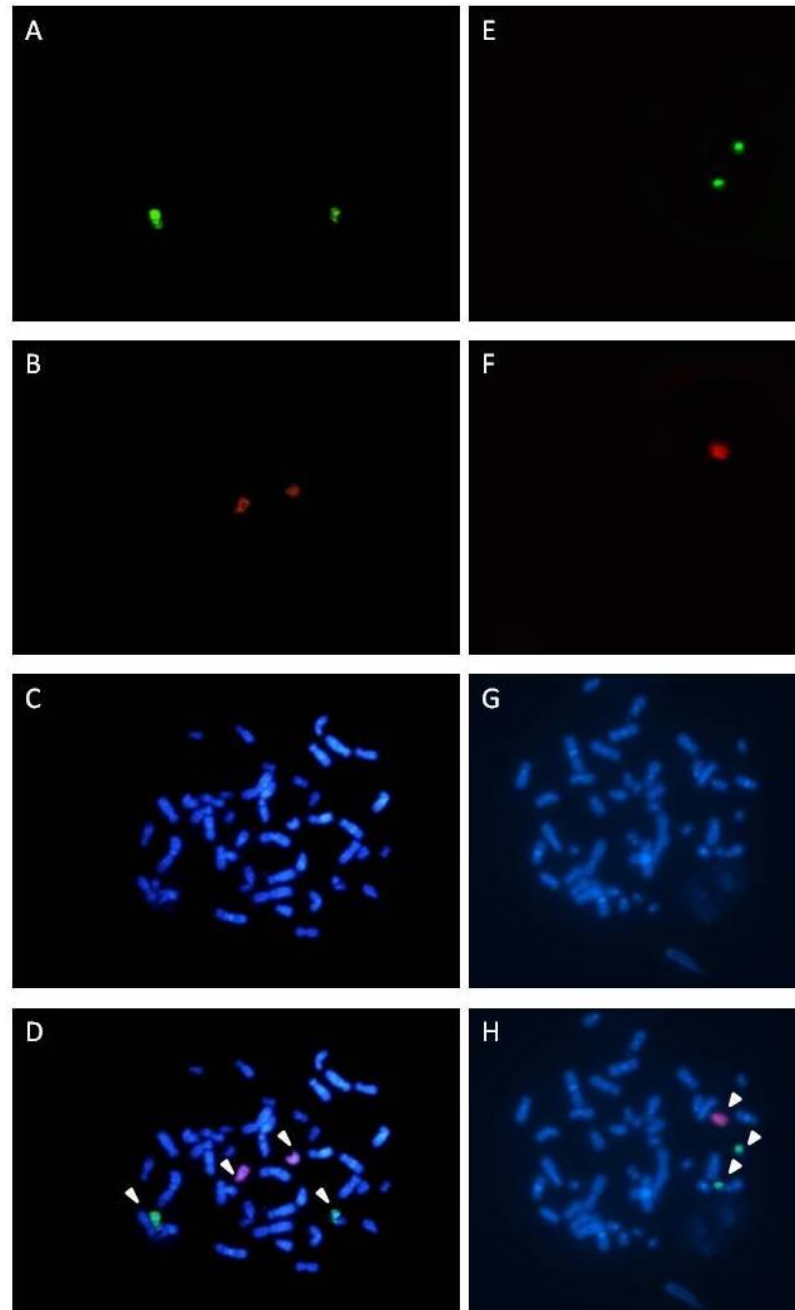


Figura 30: Hibridização *in situ* do cromossomo 14 (lócus genético da proteína presenilina 1) e do cromossomo 21 (Lócus genético da proteína precursora amilóide). Imagens A, B, C e D representam o grupo controle e as imagens E, F, G e H representam o grupo DA. Sonda do cromossomo humano 14 (SCH14) marcadas com Cy3 (vermelho) e sonda do cromossomo 21 marcadas com FITC (verde) e contra coradas com DAPI (azul)

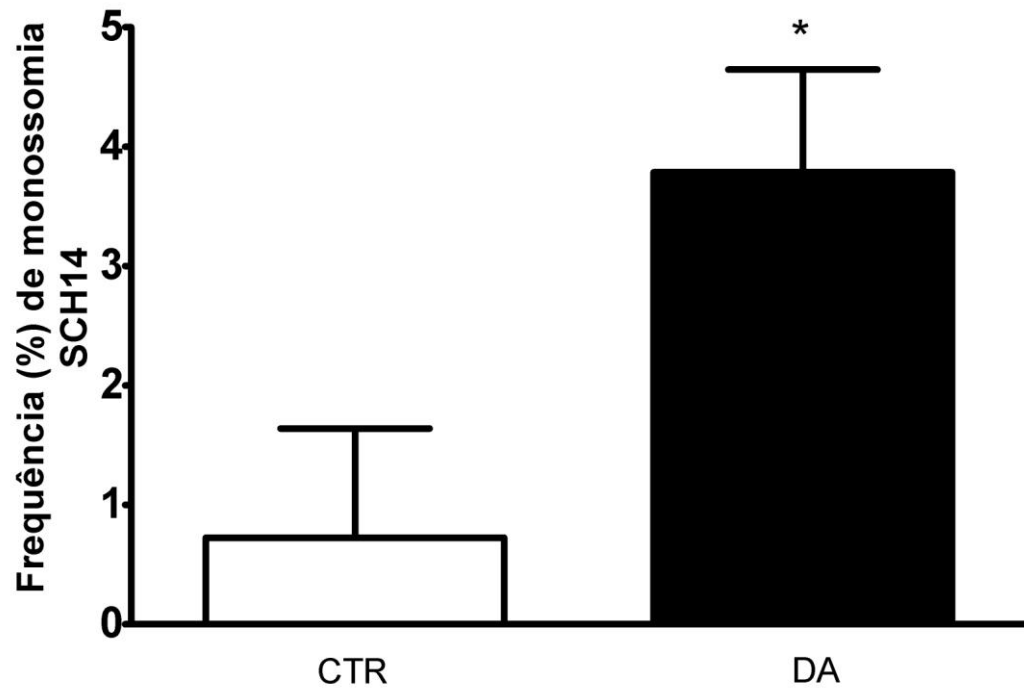


Figura 31: Frequência de monossomia do cromossomo 14 no grupo controle (CTR) e Alzheimer (DA); com \*\*\*  $p=0,0286$  (*TEST t de Student*, seguido do pós-teste *Mann-Whitney*).

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. QUESTIONÁRIO SOCIOECONÔMICO E FATORES DE RISCO

Além dos fatores genéticos contribuírem para o aparecimento da doença de Alzheimer, outros fatores ligados ao estilo de vida também podem influenciar no surgimento da DA. Vários estudos demonstram que o principal fator de risco para desenvolver a doença é o envelhecimento (LOBO et al., 2000). Das respostas ao questionário sócio-econômico, observamos que a média de idade dos integrantes do grupo DA ( $81,9 \pm 4,7$ ) e controle ( $79,4 \pm 9,5$ ) são semelhantes. Este fato descarta a idade como um fator de confusão no presente trabalho.

De acordo com Letenneur e colaboradores (2004) o fumo de tabaco diminui o risco de desenvolver demência devido a alterações em vias colinérgicas e consequente induz neuroproteção. Nossos resultados demonstram que o grupo controle possui 40% de indivíduos fumantes crônicos e a frequência de alteração cromossômica deste grupo é baixa em relação ao grupo DA, que possui uma taxa de 20% de fumantes crônicos.

### 6.2. TÉCNICA PARA ESTUDO CROMOSSÔMICO

A técnica utilizada neste trabalho possui um baixo grau de invasividade e foi baseada em estudos citogenéticos humanos já estabelecidos (PARK e SEO, 2011), utilizando a cultura de linfócitos para a extração dos cromossomos metafásicos (BIALOPIOTROWICZ et al., 2011; KISHI et al., 1987; TAWN, 1988). A análise dos cromossomos pode ser realizada através da citogenética clássica ou da citogenética molecular (VASSAR et al.), tanto em células metafásicas quanto interfásicas (GELLER e POTTER, 1999).

### 6.3. ESTUDO CROMOSSÔMICO-NUMÉRICO NA DOENÇA DE ALZHEIMER

Atualmente, vários estudos têm demonstrado que algumas doenças neurodegenerativas e também distúrbios psiquiátricos, podem surgir devido à instabilidade estrutural e/ou numérica dos cromossomos (SMALL e MAYEUX, 2007; WAKABAYASHI e STROOPER, 2008). Essas alterações são variadas e podem ocorrer por **rearranjos cromossômicos ou subcromossômicos** que causam modificações estruturais (deleções, duplicações, inversões e translocações) nos cromossomos (BIALOPIOTROWICZ et al., 2011), como por exemplo: **heteromorfismo cromossômico** (mudanças heterocromáticas) (EPSTEIN, 1990), **fragilidade**

**cromossômica** (ocorrendo quebra em lócus específicos do cromossomo), (KISHI et al., 1987) e **aneuploidia e/ou poliploidia cromossômica** (perda ou ganho do cromossomo inteiro) (TAWN, 1988).

Estudos relacionando as variações cromossômicas com as doenças neurodegenerativas, ainda são raros. E as primeiras tentativas de relacionar alterações cromossômicas com a DA focalizaram na trissomia do cromossomo 21, que é a alteração cromossômica numérica característica em portadores da Síndrome de Down (ROYSTON et al., 1999). Alguns estudos demonstraram que os portadores da Síndrome de Down apresentavam processos fisiopatológicos idênticos às pessoas acometidas pela DA (ROYSTON et al., 1999). Posteriormente, ficou caracterizado que os portadores de Síndrome de Down expressam três vezes mais a PPA que, por sua vez, sofre clivagem proteolítica e gera a proteína  $\beta$ A no tecido nervoso (EPSTEIN, 1990). Nossos resultados iniciais não demonstraram alterações no cromossomo 21 envolvendo monossomia e/ou trissomia. Porém, Geller e Potter (1999) mostraram que o processo de trissomia do cromossomo 21 pode estar intimamente relacionado com a patogênese da doença de Alzheimer.

De acordo com Boeras e colaboradores (2008), alterações monossômicas são mais frequentes que as alterações trissômicas. Resultados semelhantes foram encontrados no presente trabalho, onde a monossomia ocorreu com uma frequência entre 06 – 20%, enquanto a frequência de trissomia variou entre 4 – 8%. No encéfalo de uma pessoa normal, espera-se uma frequência de aneuploidia em torno de 0,5 % para cada cromossomo, totalizando aproximadamente 10 % de monossomia (IOUROV et al., 2009). Um portador de DA possui uma frequência média de aneuploidia entre 8 – 15 % (IOUROV et al., 2009). A Ataxia Telangiectasia (BIALOPIOTROWICZ et al., 2011). uma doença neurodegenerativa rara é associada com uma frequência elevada de monossomia, atingindo 50 % (IOUROV et al., 2009).

#### 6.4. A RELAÇÃO ENTRE O MEEM E AS ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS

Nossos resultados demonstraram que o desempenho cognitivo no teste MEEM é inversamente proporcional as alterações de monossomia e trissomia. Esses resultados independem do aumento do mosaïcismo cromossômico em decorrência do envelhecimento (FAGGIOLI et al., 2011; PERCY et al., 2005; SIKORA et al., 2011). Outra estrutura relacionada com o aumento da instabilidade cromossômica é a região telomérica responsável



por dar estabilidade ao cromossomo, evitando perda de parte do genoma ou fusões cromossomais (TAKUBO et al., 2010).

Estudo em pacientes com Síndrome de Down no decorrer do envelhecimento demonstrou que os indivíduos com idade elevada apresentavam cerca de 2 – 4 % de células com cromossomo 21 em seu estado diploides, ou seja, um grupo de células perdeu sua característica trissômica, voltando a normalidade (PERCY et al., 2005). Esse estudo mostra que o mosaicismos possui grande papel na diversificação genômica das células, podendo ser benéficas ou não (PERCY et al., 2005).

Para a verificação do aspecto monossômico ligado ao envelhecimento, realizamos então o teste de correlação entre o grupo controle e variáveis como idade e alterações cromossômicas. Observamos que a idade, no grupo controle, é responsável pelo aumento do mosaicismos cromossômico, como a literatura sugere (CALLÉN e SURRALLÉS, 2004; KORMANN-BORTOLOTTI et al., 1996; STONE e SANDBERG, 1995).

Utilizando também as variáveis como idade e alterações cromossômicas, constatamos que o mosaicismos não segue uma tendência como na senescência celular em decorrência do envelhecimento, mas apresenta uma grande frequência de monossomia restrita entre 75 – 85 anos de idade formando um *cluster* de aneuploidia.

## 6.5. O PAPEL DE CADA CROMOSSOMO NA DOENÇA DE ALZHEIMER

Os trabalhos sobre o papel de cada cromossomo e como eles contribuem para a DA estão restritos ao par 21, devido sua relação com a expressão aumentada de PPA, principal proteína envolvida com a doença. O aumento na expressão da proteína é provocado pela trissomia (Geller e Potter, 1999). Além do cromossomo 21, nossos estudos verificaram alterações numéricas nos cromossomos 1 e 14.

O cromossomo 1 representou 4 – 5 % das alterações totais de monossomia e a monossomia do cromossomo 14 representou 1 – 2 % das alterações totais de monossomia.

Alterações no gene da *PS-1* e *PS-2* podem potencializar a via amiloidegênica contribuindo para o surgimento das alterações no parênquima cerebral associadas com a DA (BOERAS et al., 2008). Vários estudos têm demonstrado que mutações no gene *PS-1* provoca o aumento em 20% de aneuploidias, juntamente com a superprodução de proteína beta amiloide (BOERAS et al., 2008; DUFF et al., 1996).

Nossos resultados demonstraram que os cromossomos 1 e 14 participam com 7% do processo de alteração cromossomo-numérica, sendo considerado uma participação

relativamente baixa. Porém, o estudo de Boeras e colaboradores (2008) também demonstrou que o gene *PS-1* possui importante papel na regulação do ciclo celular, podendo alterar o grau de condensação do cromossomo, além do centrossomo, causando a distribuição dos microtúbulos de forma desorganizada. Estudo envolvendo o gene *PS-2* mostrou que a mutação desse gene causa a diminuição ou até mesmo a interrupção do ciclo celular (JANICKI e MONTEIRO, 1999; JANICKIA et al., 2000).

## 7. CONCLUSÃO

- As mulheres com diagnóstico preliminar de DA apresentam uma frequência elevada de alteração cromossômica (monossomia e trissomia) em comparação com o grupo controle;
- Evidenciamos uma correlação positiva entre alteração cromossômica e o nível de déficit cognitivo avaliado pelo MEEM;
- Existe uma correlação positiva entre idade e frequência de monossomia. O mesmo ocorre para a trissomia;
- Não constatamos eventos de trissomia ou monossomia ligadas ao cromossomo 21 responsável por abrigar o gene PPA;
- Alterações de monossomia nos cromossomos que abrigam o cromossomo 1 e 14 podem estar influenciando na instabilidade de outros cromossomos, podendo contribuir para o aparecimento da doença ou piora cognitiva do paciente.

## REFERÊNCIAS

- ALLINSON, T. M.; PARKIN, E. T.; TURNER, A. J. e HOOPER, N. M. ADAMs family members as amyloid precursor protein  $\alpha$ -secretases. **Journal Neuroscience Research**, v. 74, p. 342 – 352, 2003.
- AMARAL, P. J. S.; FINOTELO, L. F. M.; DE OLIVEIRA, E. H. C.; PISSINATTI, A.; NAGAMACHI, C. Y. e PIECZARKA, J. C. Phylogenetic studies of the genus *Cebus* (Cebidae-Primates) using chromosome painting and G-banding. **BMC Evolutionary Biology** (Online), v. 8, p. 169, 2008.
- BAJIC, V. P.; SPREMO-POTPAREVIC, B.; IVKOVIC', L. Z.; BONDA, D. J.; SIEDLAK, S. L.; CASADESUS, G.; LEE, H.-G. e SMITH, M. A. The X-chromosome instability phenotype in Alzheimer's disease: A clinical sign of accelerating aging? **Medical Hypotheses**, v. 73, p. 917 – 920, 2009.
- BALES, K. R.; VERINA, T.; DODEL, R. C.; DU, Y.; ALTSTIEL, L.; BENDER, M.; HYSLOP, P.; JOHNSTONE, E. M.; LITTLE, S. P.; CUMMINS, D. J.; PICCARDO, P.; GHETTI, B. e PAUL, S. M. Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid beta-peptide deposition. **Nature Genetics**, v. 17, p. 263 - 264, 1997.
- BALLATORE, C.; LEE, V. M.-Y. e TROJANOWSKI, J. Q. Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, p. 663 - 672, 2007.
- BATEMAN, R. J.; AISEN, P. S.; STROOPER, B. D.; FOX, N. C.; LEMERE, C. A.; RINGMAN, J. M.; SALLOWAY, S.; SPERLING, R. A.; WINDISCH, M. e XIONG, C. Autosomal-dominant Alzheimer's disease: a review and proposal for the prevention of Alzheimer's disease. **Alzheimer's Research & Therapy**, v. 3, n. 1, 2001.
- BEHL, C.; DAVIS, J. B.; LESLEY, R. e SCHUBERT, D. Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. **Cell**, v. 77, p. 817 – 827, 1994.
- BENSEMAIN, F.; HOT, D.; FERREIRA, S.; DUMONT, J.; BOMBOIS, S.; MAURAGE, C. A.; HUOT, L.; HERMANT, X.; LEVILLAIN, E. e HUBANS, C. Evidence for induction of the ornithine transcarbamylase expression in Alzheimer's disease. **Molecular Psychiatry** v. 14, p. 106 – 116, 2009.
- BERTRAM, L. e HAMPEL, H. The role of genetics for biomarker development in neurodegeneration. **Prog Neurobiol.**, 2011.
- BERTRAM, L.; LILL, C. M. e TANZI, R. E. The Genetics of Alzheimer Disease: Back to the Future. **Neuron**, v. 68, p. 270 - 281, 2010.
- BIALOPIOTROWICZ, E.; KUZNIEWSKAA, B.; KACHAMAKOVA-TROJANOWSKAA, N.; BARCIKOWSKAB, M.; KUZNICKIA, J. e WOJDAA, U. Cell cycle regulation distinguishes lymphocytes from sporadic and familial Alzheimer's disease patients. **Neurobiology of Aging**, v. 32, n. 12, p. 2319.e2313–2319.e2326, 2011.

BIAN, L.; YANG, J. D.; GUO, T. W.; DUAN, Y.; QIN, W.; SUN, Y.; FENG, G. Y. e HE, L. Association Study of the A2M and LRP1 Genes with Alzheimer Disease in the Han Chinese. **Biological Psychiatry**, v. 58, p. 731 – 737, 2005.

BLENNOW, K.; DE LEON, M. J. e ZETTERBERG, H. Alzheimer's Disease. **Lancet**, v. 8, n. 36, p. 387 - 403, 2006.

BOERAS, D. I.; GRANIC, A.; PADMANABHAN, J.; CRESPO, N. C.; ROJIANI, A. M.; POTTER, H. e AISEN, P. S. Alzheimer's presenilin 1 causes chromosome missegregation and aneuploidy. **Neurobiology of Aging**, v. 29, p. 319 – 328, 2008.

BRUN, A. e ENGLUND, E. Brain changes in dementia of Alzheimer's type relevant to new imaging diagnostic methods. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 10, p. 297 - 308, 1986.

BRUNDEN, K. R.; TROJANOWSKI, J. Q. e LEE, V. M. Y. Advances in tau-focused drug discovery for Alzheimer's disease and related tauopathies. **Nature Reviews | Drug Discovery**, v. 8, p. 783 - 793, 2009.

BUSFIELD, F. e GOATE, A. M. The genetics of Alzheimer's disease and mutations in the Amyloid 13-protein precursor gene. em LIMITED, A. P., ed. Pathobiology of Alzheimer's Disease St Louis, Missouri. p. 59 - 78. 1995.

BUSH, A. e BEAIL, N. Risk factors for dementia in people with down syndrome: issues in assessment and diagnosis. **Am J Ment Retard**, v. 109, n. 2, p. 83 – 97, 2004.

CALDAS, C. P. Envelhecimento com dependência: responsabilidades e demandas da família. **Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro**, v. 19, n. 3, p. 773 - 781, 2003.

CALLÉN, E. e SURRALLÉS, J. Telomere dysfunction in genome instability syndromes. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 567, n. 1, p. 85 – 104, 2004.

CAMARGO, I. E. DOENÇA DE ALZHEIMER. AGE ed., Porto Alegre, RS.: 2003, 143 p.  
CARBONI, R. M. e REPPETTO, M. A. Uma reflexão sobre a assistência à saúde do idoso no Brasil. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v. 9, n. 1, p. 251 - 260, 2007.

CHARTIER-HARLIN, M. C.; CRAWFORD, F.; HOULDEN, H.; WARREN, A.; HUGHES, D.; FIDANI, L.; GOATE, A.; ROSSOR, M.; ROQUES, P.; HARDY, J. e MULLAN, M. Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the  $\beta$ -amyloid precursor protein gene. **Nature**, v. 353, p. 844 – 846, 1991.

CHAU, D.-M.; CRUMP, C. J.; VILLA, J. C.; SCHEINBERG, D. A. e LI, Y.-M. Familial Alzheimer Disease Presenilin-1 Mutations Alter the Active Site Conformation of  $\beta$ -secretase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 21, p. 17288 - 17296, 2012.

CHAVES, M. L. F. Memória Humana: Aspectos Clínicos e Modulação Por Estados Afetivos. **Psicologia da USP**, v. 4, n. 2, p. 139 - 169, 1993.

CLARK, C. M.; DAVATZIKOS, C.; BORTHAKUR, A.; NEWBERG, A.; LEIGHT, S. e TROJANOWSKI, J. Q. Biomarkers for Early Detection of Alzheimer Pathology. **Neurosignals**, v. 16, p. 11 - 18, 2008.

CUMMINGS, J. L. Drug Therapy: Alzheimer's disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 1, n. 35, p. 56 - 67, 2004.

DAHM, R. Alzheimer's discovery. **Current Biology**, v. 16, n. 21, p. R906 - R910, 2006.

DEMURO, A.; PARKER, I. e STUTZMANN, G. E. Calcium Signaling and Amyloid Toxicity in Alzheimer Disease. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 17, p. 12463 - 12468, 2010.

DENG, G.; SU, J. H. e COTMAN, C. W. Gene expression of Alzheimer-associated presenilin-2 in the frontal cortex of Alzheimer and aged control brain. **FEBS Letters** v. 394, p. 17 - 20, 1996.

DICKSON, D. W. The pathogenesis of senile plaques. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 56, p. 321 - 339, 1997.

DUFF, K.; ECKMAN, C.; ZEHR, C.; YU, X.; PRADA, C. M.; PEREZ-TUR, J.; HUTTON, M.; BUEE, L.; HARIGAYA, Y.; YAGER, D.; MORGAN, D.; GORDON, M. N.; HOLCOMB, L.; REFOLO, L.; ZENK, B.; HARDY, J. e YOUNKIN, S. Increased amyloidbeta42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. **Nature**, v. 383, n. 6602, p. 710 - 713, 1996.

DUMANCHIN, C.; BRICE, A. e CAMPION, D. Presenilin 1 mutations are rare in clinically sporadic, early onset Alzheimer's disease cases. **Journal of Medical Genetics**, v. 35, n. 8, p. 672 - 673, 1998.

EASTWOOD, R. e REISBERG, B. Mood and behaviour. em GAUTHIER, S., ed. Clinical diagnosis and management of Alzheimer's disease. London: Martin Dunitz. p. 175 - 190. 1996.

EPSTEIN, C. J. The consequences of chromosome imbalance. **American Journal Medicine Genetics**, p. 31 - 37, 1990.

FAGGIOLI, F.; VIJG, J. e MONTAGNA, C. Chromosomal aneuploidy in the aging brain. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 132, n. 8-9, p. 429 - 436, 2011.

FITZGERALD, P. H.; ARCHER, S. A. e MORRIS, C. M. Evidence for the repeated primary non-disjunction of chromosome 21 as a result of premature centromere division (PCD). **Human Genetics**, v. 72, p. 58 - 62, 1986.

FOLSTEIN, M. F.; FOLSTEIN, S. E. e MCHUGH, P. R. Mini-mental state: a practical method for grading the cognitivestate of patients for the clinician. **Journal of Psychiatric Research**, v. 12, p. 189 - 198, 1975.

FORMAN, M. S.; TROJANOWSKI, J. Q. e LEE, V. M.-Y. Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs. **Nature Medicine**, v. 10, n. 10, p. 1055 - 1063, 2004.

GALASKO, D. Biomarkers for Alzheimer's disease – Clinical needs and application. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 8, p. 339 – 346, 2005.

GELLER, L. N. e POTTER, H. Chromosome Missegregation and Trisomy 21 Mosaicism in Alzheimer's Disease. **Neurobiology of Disease**, v. 6, p. 167 – 179, 1999.

GLENNER, G. G. e WONG, C. W. Alzheimer disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 120, n. 3, p. 885 - 890, 1984.

GOATE, A.; CHARTIER-HARLIN MC; MULLAN, M.; BROWN, J.; CRAWFORD, F.; FIDANI, L.; GIUFFRA, L.; HAYNES, A.; IRVING, N.; JAMES, L.; MANT, R.; NEWTON, P.; ROOKE, K.; ROQUES, P.; TALBOT, C.; PERICAK-VANCE, M.; ROSES, A.; WILLIAMSON, R.; ROSSOR, M.; OWEN, M. e HARDY, J. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. **Nature**, v. 349, p. 704 – 706, 1991.

GOLAN, M. P.; STYCZYŃSKA, M.; JÓŹWIAK, K.; WALECKI, J.; MARUSZAK, A.; PNIEWSKI, J.; LUGIEWICZ, R.; FILIPEK, S.; ZEKANOWSKI, C. e BARCIKOWSKA, M. Early-onset Alzheimer's disease with a de novo mutation in the presenilin 1 gene. **Experimental Neurology**, v. 208, p. 264 – 268, 2007.

GOMES-LEAL, W.; CORKILL, D. J.; FREIRE, M. A.; PICANCO-DINIZ, C. W. e PERRY, V. H. Astrocytosis, microglia activation, oligodendrocyte degeneration, and pyknosis following acute spinal cord injury. **Experimental Neurology** v. 190, n. 456 – 467, 2004.  
HALEY, W. E. The family caregiver's role in Alzheimer's disease. **Neurology**, v. 48, p. S25 - S29, 1997.

HAMPEL, H.; GOERNITZ, A. e BUERGER, K. Advances in the development of biomarkers for Alzheimer's disease: from CSF total tau and A<sub>1-42</sub> proteins to phosphorylated tau protein. **Brain Research Bulletin**, v. 61, p. 243 – 253, 2003.

HEAD, E. e LOTT, I. T. Down syndrome and beta-amyloid deposition. **Current Opinion in Neurology**, v. 17, n. 2, p. 95 –100, 2004.

HEBERT, L. E.; SCHERR, P. A.; BIENIAS, J. L.; BENNETT, D. A. e EVANS, D. A. Alzheimer Disease in the US Population Prevalence Estimates Using the 2000 Census. **Archives of Neurology**, v. 60, p. 1119 - 1122, 2003.

HICKEY, J. L. e DONNELLY, P. S. Diagnostic imaging of Alzheimer's disease with copper and technetium complexes **Coordination Chemistry Reviews** p. 14, 2012.

HO, A. e SHEN, J. Presenilins in synaptic function and disease of the paired helical filament of Alzheimer. **Trends in Molecular Medicine**, v. 17, n. 11, p. 617 - 624, 2001.

HOPE, C.; METTENBURG, J.; GONIAS, S. L.; DEKOSKY, S. T.; KAMBOH, M. I. e CHUA, C. T. Functional analysis of plasma  $\alpha_2$ -macroglobulin from Alzheimer's disease patients with the A2M intronic deletion. **Neurobiology of Disease**, v. 14, p. 504 – 512, 2003.

IOUROV, I. Y.; VORSANOVA, S. G.; LIEHR, T. e YUROV, Y. B. Aneuploidy in the normal, Alzheimer's disease and ataxia-telangiectasia brain: Differential expression and pathological meaning. **Neurobiology of Disease**, v. 34, p. 212 – 220, 2009.

IWATSUBO, T.; ODAKA, A.; SUZUKI, N.; MIZUSAWA, H.; NUKINA, N. e IHARA, Y. Visualization of A $\beta$  42 (43) and A $\beta$  40 in senile plaques with end-specific A $\beta$  monoclonals: evidence that an initially deposited species is A $\beta$  42. **Neuron**, v. 13, n. 43, p. 45 – 53, 1994.

JANICKI, S. M. e MONTEIRO, M. J. Presenilin Overexpression Arrests Cells in the G1 Phase of the Cell Cycle : Arrest Potentiated by the Alzheimer's Disease PS2 (N141) Mutant. **The American Journal of Pathology**, v. 155, n. 1, p. 135 – 144, 1999.

JANICKIA, S. M.; STABLER, S. M. e MONTEIRO, M. J. Familial Alzheimer's disease presenilin-1 mutants potentiate cell cycle arrest. **Neurobiology of Aging**, v. 21 n. 6, p. 829 – 836, 2000.

JARRETT, J. T.; BERGER, E. P. e LANSBURY, P. T. J. The carboxy terminus of the  $\beta$  amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Biochemistry**, v. 32, p. 4693 – 4697 1993.

JUCKER, M. e WALKER, L. C. Pathogenic Protein Seeding in Alzheimer Disease and Other Neurodegenerative Disorders. **Annals of Neurology**, v. 70, n. 4, p. 533 - 540, 2011.

KANG, J.; LEMAIRE, H. G.; UNTERBECK, A.; SALBAUM, J. M.; MASTERS, C. L.; GRZESCHIK, K. H.; MÜLTHAUP, G.; BEYREUTHER, K. e MÜLLER-HILL, B. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. **Nature**, v. 325, p. 733 – 736, 1987.

KIKKAWA, M.; ISHIKAWA, T.; NAKATA, T.; WAKABAYASHI, T. e HIROKAWA, N. Direct visualization of the microtubule lattice seam both in vitro and in vivo. **Journal Cell Biology**, v. 127, p. 1965 - 1971., 1994.

KIM, J.; BASAK, J. M. e HOLTZMAN, D. M. The Role of Apolipoprotein E in Alzheimer's Disease. **Neuron**, v. 63, p. 287 - 303, 2009.

KINSELLA, K. e VELKOFF, V. A. An Aging World: 2001. Washington, DC: U.S. Government Printing Office. p. 190. 2001.

KISHI, K.; HOMMAB, A.; KAWAA, A. e KADOWAKIC, K. Age related change in the frequency of ara c-induced chromosome aberrations in human peripheral blood lymphocytes. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 37, n. 3, p. 211 – 219, 1987.

KLUNK, W. E.; PANCHALINGAM, K.; MCCLURE, R. J.; STANLEY, J. A. e PETTEGREW, J. W. Metabolic Alterations in Postmortem Alzheimer's Disease Brain are Exaggerated by Apo-E4. **Neurobiology of Aging**, v. 19, n. 6, p. 511 – 515, 1998.

KOOLEN, D. A.; VISSERS, L. E.; PFUNDT, R.; DE LEEUW, N.; KNIGHT, S. J.; REGAN, R.; KOOY, R. F.; REYNIERS, E.; ROMANO, C.; FICHERA, M.; SCHINZEL, A.; BAUMER, A.; ANDERLID, B. M.; SCHOUMANS, J.; KNOERS, N. V.; VAN KESSEL, A. G.; SIS-TERMANS, E. A.; VELTMAN, J. A.; BRUNNER, H. G. e B., D. V. B. A new



chromosome 17q21.31 microdeletion syndrome associated with a common inversion polymorphism. **Nature Genetics**, v. 38, p. 999 – 1001, 2006.

KORMANN-BORTOLOTTI, M. H.; BORSATTO, B. e SMITH, M. A. C. Telomere shortening, ageing, and chromosome damage. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 89, n. 1, p. 45 - 49, 1996.

KOVACS, D. M. Alfa 2-Macroglobulin in late-onset Alzheimer's disease. **Experimental Gerontology**, v. 35, p. 473 – 479, 2000.

LAFERLA, F. M.; GREEN, K. N. e ODDO, S. Intracellular amyloid- $\beta$  in Alzheimer's disease. **Nature Reviews Neuroscience** v. 8, p. 499 - 509, 2007.

LARNER, A. J. Intrafamilial clinical phenotypic heterogeneity with MAPT gene splice site IVS10+16C>T mutation. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 287, p. 253 – 256, 2009.

LARNER, A. J. resenilin-1 mutation Alzheimer's disease: A genetic epilepsy syndrome? **Epilepsy & Behavior**, v. 21, p. 20 – 22, 2011.

LETENNEUR, L.; LARRIEU, S. E GATEU-BARBERGER, P. Alcohol and tobacco consumption as risk factors of dementia: a review of epidemiological studies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 52, p. 95–99. 2004.

LI, J.; XU, M.; ZHOU, H.; MA, J. e POTTER, H. Alzheimer presenilins in the nuclear membrane, interphase kinetochores, and centrosomes suggest a role in chromosome segregation. **Cell**, v. 90, p. 917 – 927, 1997.

LINDEBOOM, J. e WEINSTEIN, H. Neuropsychology of cognitive ageing, minimal cognitive impairment, Alzheimer's disease, and vascular cognitive impairment. **European Journal of Pharmacology**, v. 3, n. 490, p. 83 - 86, 2004.

LLADÓ, A.; RODRÍGUEZ-SANTIAGO, B.; ANTONELL, A.; SÁNCHEZ-VALLE, R.; MOLINUEVO, J. L.; RENÉ, R. e PÉREZ-JURADO, L. A. MAPT gene duplications are not a cause of frontotemporal lobar degeneration. **Neuroscience Letters**, v. 424, p. 61 – 65, 2007.

LOBO, A.; LAUNER, L. J.; FRATIGLIONI, L.; ANDERSEN, K.; DI CARLO, A.; BRETELER, M. M.; COPELAND, J. R.; DARTIGUES, J. F.; JAGGER, C.; MARTINEZ-LAGE, J.; SOININEN, H. e HOFMAN, A. Gender differences in the incidence of AD and vascular dementia. **Neurology**, v. 53, n. 9, 1999.

LOBO, A.; LAUNER, L. J.; FRATIGLIONI, L.; ANDERSEN, K.; DI CARLO, A.; BRETELER, M. M.; COPELAND, J. R.; F., D. J.; JAGGER, C.; MARTINEZ-LAGE, J.; SOININEN, H. e HOFMAN, A. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. Prevalence of dementia and major subtypes in Europe: a collaborative study of population-based cohorts. **Neurology** v. 54, p. S4 – 9, 2000.

LOPES, M. A. e BOTTINO, C. M. C. Prevalência da demência em diversas regiões do mundo. **Arquivo de Neuropsiquiatria, São Paulo**, v. 60, n. 1, p. 61 - 69, 2002.

LOURENÇO, R. A. e VERASI, R. P. Mini-Exame do Estado Mental: características psicométricas em idosos ambulatoriais. **Revista de Saúde Pública**, v. 4, n. 40, p. 712 - 719, 2006.

LUZARDO, A. R.; GORINI, M. I. P. C. e SILVA, A. P. S. S. Características de idosos com doença de Alzheimer e seus cuidadores: uma série de casos em um serviço de neurogeriatria. **Revista Texto & Contexto Enfermagem**, v. 15, p. 587 - 594, 2006.

MANDYBUR, T. I. e CHUIRAZZI, C. C. Astrocytes and the plaques of Alzheimer's disease. **Neurology**, v. 40, p. 635 - 639, 1990.

MAURER, K.; YOLK, S. e GERBALDO, H. Auguste D e doença de Alzheimer. **Lancet**, v. 349, p. 1546 - 1549, 1997.

MAZANETZ, M. P. e FISCHER, P. M. Untangling tau hyperphosphorylation in drug design for neurodegenerative diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, p. 464 - 479, 2007.

MEHES, K. e BUHLER, E. M. Premature centromere division: a possible manifestation of chromosome instability. **Journal of Medical Genetics**, v. 56, p. 76 - 79, 1995.

MOLINUEVO, J. L.; LLADÓ, A. e RAMI, L. Memantine: Targeting glutamate excitotoxicity in Alzheimer's disease and other dementias. **American Journal of Alzheimer's Disease and Other Dementias**, v. 20, n. 2, p. 77 - 85, 2005.

MOORE, A. H. e O'BANION, M. K. Neuroinflammation and anti-inflammatory therapy for Alzheimer's disease. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 1627 - 1656, 2002.

MOSCH, B.; MORAWSKI, M.; MITTAG, A.; LENZ, D.; TARNOK, A. e ARENDT, T. Aneuploidy and DNA Replication in the Normal Human Brain and Alzheimer's Disease. **The Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 26, p. 6859 - 6867, 2007.

MOUSSA, C. E.-H.; FU, Q.; KUMAR, P.; SHTIFMAN, A.; LOPEZ, J. R.; ALLEN, P. D.; LAFERLA, F.; WEINBERG, D.; MAGRANE, J.; APRAHAMIAN, T.; WALSH, K.; ROSEN, K. M. e QUERFURTH, H. W. Transgenic expression of  $\beta$ -APP in fast-twitch skeletal muscle leads to calcium dyshomeostasis and IBM-like pathology. **The FASEB Journal**, v. 20, p. 2165 - 2167, 2006.

NAKAGAWA, T.; ZHU, H.; MORISHIMA, N.; LI, E.; XU, J.; YANKNER, B. A. e YUAN, J. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. **Nature**, v. 403, p. 98 - 103, 2000.

NITRINI, R. Demência e doença de Alzheimer no Brasil. **Jornal Brasileiro de Neuropsiquiatria e Geriatria**, v. 3, n. 1, p. 6 - 7, 2002.

NITRINI, R.; CARAMELLI, P.; BOTTINO, C. M.; DAMASCENO, B. P.; BRUCKI, S. M. e ANGHINAH, R. Diagnóstico de doença de Alzheimer no Brasil: avaliação cognitiva e funcional. Recomendações do departamento científico de neurologia cognitiva e do envelhecimento da Academia Brasileira de Neurologia. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 3, n. 63, p. 720 - 727, 2005.

NORDENSON, I.; ADOLFSSON, R.; BECKMAN, G.; BUCHT, G. e WINBLAD, B. Chromosomal abnormality in dementia of Alzheimer type. **Lancet**, v. 1, n. 8166, p. 481 – 482, 1980.

NUSSBAUM, R. L. e ELLIS, C. E. Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. **The new england journal of medicine**, v. 348, p. 1356 - 1364, 2003.

OJOPI, E. P. B.; BERTONCINI, A. B. e NETO, E. D. Apolipoproteína E e a doença de Alzheimer. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 31, n. 1, p. 26 - 33, 2004.

OSTBYE, T. e CROSSE, E. Net economic costs of dementia in Canada. **Canadian Medical Association Journal**, v. 151, p. 1457 - 1463, 1994.

PARK, H. e SEO, J. Application of multidimensional scaling to quantify shape in Alzheimer's disease and its correlation with Mini Mental State Examination: A feasibility study. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 194, n. 2, p. 380 – 385, 2011.

PERCY, C.; PAT, B.; PORONNIK, P. e GOBE, G. Role of oxidative stress in age-associated chronic kidney pathologies. **Advances in Chronic Kidney Disease**, v. 12, n. 1, p. 78 - 83, 2005.

PETERSEN, R. C. Mild cognitive impairment as a diagnostic entity. **Journal of Internal Medicine**, v. 256, n. 3, p. 183 - 194, 2004.

PICCINI, A.; ZANUSSO, G.; BORGHI, R.; NOVIELLO, C.; MONACO, S.; RUSSO, R.; DAMONTE, G.; ARMIROTTI, A.; GELATI, M.; GIORDANO, R.; ZAMBENEDETTI, P.; RUSSO, C.; GHETTI, B. e TABATON, M. Association of a presenilin 1 S170F mutation with a novel Alzheimer disease molecular phenotype. **Archives of Neurology**, v. 64, p. 738 – 745, 2007.

POTTER, H. Review and Hypothesis: Alzheimer Disease and Down Syndrome-Chromosome 21 nondisjunction may under lie both Disorders. **The American Journal of Human Genetics**, v. 48, p. 1192 - 1200, 1991.

PRINCE, M. Epidemiology of dementia. **Psychiatry**, v. 3, n. 12, p. 11 -13, 2004.

RAMOS, L. R.; VERAS, R. P. e KALACHE, A. Envelhecimento populacional: uma realidade brasileira. **Revista de Saúde Pública**, v. 21, p. 211 - 224, 1987.

REICHMAN, W. E. e CUMMINGS, J. L. Demência. em DUTHIE JUNIOR, E. H. e KATZ, P. R., eds. Geriatria prática. São Paulo: Revinter. p. 259 - 261. 2002.

ROSES, A. D. Apolipoprotein E affects the rate of Alzheimer's disease expression: Beta-amyloid burden is a secondary consequence dependent on APOE genotype and duration of disease. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 53, p. 429 – 437, 1994.

ROYSTON, M. C.; MCKENZIE, J. E.; GENTLEMAN, S. M.; SHENG, J. G.; MANN, D. M. A.; GRIFFI, W. S. T. e MRAK, R. E. Overexpression of S100b in Down's syndrome: Correlation with patient age and with b-amyloid deposition. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 25, p. 387 – 393, 1999.

RUBINSZTEIN, D. C.; HANLON, C. S.; IRVING, R. M.; GOODBURN, S.; EVANS, D. G. R.; KELLER-WOOD, H.; XUEREB, J. H.; BANDMANN, O. e HARDING, A. E. Apo E genotypes in multiple sclerosis, Parkinson's disease, schwannomas and late-onset Alzheimer's disease. **Molecular and Cellular Probes**, v. 8, n. 6, p. 519 – 525, 1994.

SCHAFER, K. N.; KIM, S.; MATZAVINOS, A. e KURET, J. Selectivity requirements for diagnostic imaging of neuro brillary lesions in Alzheimer's disease: A simulation study. **NeuroImage**, v. 60, p. 1724 – 1733, 2012.

SCHELLENBERG, G. D.; BIRD, T. D.; WIJSMAN, E. M.; ORR, H. T.; ANDERSON, L.; NEMENS, E.; WHITE, J. A.; BONNYCASTLE, L.; WEBER, J. L. e ALONSO, M. E. Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. **Science**, v. 258, p. 668 – 671, 1992.

SELKOE, D. J. Alzheimer diseases: genes, proteins and therapy. **Physiology Review**, v. 81, p. 741 – 766, 2001.

SIKORA, E.; ARENDT, T.; BENNETT, M. e NARITA, M. Impact of cellular senescence signature on ageing research. **Ageing Research Reviews**, v. 10, n. 1, p. 146 – 152, 2011.

SMALL, S. C. e MAYEUX, R. Doença de Alzheimer e Denências Relacionadas em ROWLAND, L. P., ed. Tratado de Neurologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 1151. 2007.

SNIDER, B. J.; NORTON, J.; COATS, M. A.; CHAKRAVERTY, S.; HOU, C. E.; JERVIS, R.; LENDON, C. L.; GOATE, A. M.; MCKEEL, D. W. J. e MORRIS, J. C. Novel presenilin 1 mutation (S170F) causing Alzheimer disease with Lewy bodies in the third decade of life. **Archives of Neurology**, v. 62, p. 1821 – 1830, 2005.

SOTO, C.; BRANES, M. C.; ALVAREZ, J. e INESTROSA, N. C. Structural determinants of the Alzheimer 's amyloid b-peptide. **Journal Neurochemistry**, v. 63, p. 1191 – 1198, 1994.  
SPREMO-POTPAREVIC, B.; ZIVKOVIC, L.; DJELIC, N. e BAJIC, V. Analysis of premature centromere division (PCD) of the X chromosome in Alzheimer patients through the cell cycle. **Experimental Gerontology**, v. 39, p. 849 – 854, 2004.

STEFANOVA, N.; REINDL, M.; NEUMANN, M.; HAASS, C.; POEWE, W.; KAHLE, P. J. e WENNING, G. K. Oxidative stress in transgenic mice with oligodendroglial alpha-synuclein overexpression replicates the characteristic neuropathology of multiple system atrophy. **The American Journal of Pathology**, v. 166, n. 3, p. 869-876, 2005.

STONE, J. F. e SANDBERG, A. A. Sex chromosome aneuploidy and aging. **Mutation Research/DNAging**, v. 338, n. 1-6, p. 107 – 113, 1995.

TAKUBO, K.; AIDA, J.; IZUMIYAMA, N.; ISHIKAWA, N.; FUJIWARA, M.; POON, S. S. S.; KONDO, H.; KAMMORI, M.; MATSUURA, M.; SAWABE, M.; ARAI, T.; BAIRD, D. M. e NAKAMURA, K.-I. Chromosomal instability and telomere lengths of each chromosomal arm measured by Q-FISH in human fibroblast strains prior to replicative senescence. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 131, n. 10, p. 614 – 624, 2010.

TAWN, E. J. The non-random occurrence of exchanges involving chromosomes 7 and 14 in human lymphocytes: A prospective study of control individuals. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subject**, v. 199, n. 1, p. 215 – 220, 1988.

TROJANOWSKI, J. Q.; SHAW, L.; SAYKIN, A. J.; MORRIS, J. C. e CAIRNS, N. The Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative: Progress report and future plans. **Pharmaceutical Research**, v. 6, p. 202 - 211, 2010.

TUPPO, E. E. e ARIAS, H. R. The role of inflammation in Alzheimer's disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, p. 289 – 305, 2005.

VASSAR, R.; BENNETT, B. D.; BABU-KHAN, S.; KAHN, S.; MENDIAZ, E. A.; DENIS, P.; TEPLow, D. B.; ROSS, S.; AMARANTE, P.; LOELOFF, R.; LUO, Y.; FISHER, S.; FULLER, J.; EDENSON, S.; LILE, J.; JAROSINSKI, M. A.; BIERE, A. L.; CURRAN, E.; BURGESS, T.; LOUIS, J.-C.; COLLINS, F.; TREANOR, J.; ROGERS, G. e CITRON, M.  $\beta$ -Secretase Cleavage of Alzheimer's Amyloid Precursor Protein by the Transmembrane Aspartic Protease BACE. **Science**, v. 286, p. 735 - 741 1999.

WAKABAYASHI, T. e STROOPER, B. D. Presenilins: Members of the  $\gamma$ -Secretase Quartets, But Part-Time Soloists Too. **Physiology**, v. 23, p. 194 – 204, 2008.

WALSH, D. M.; KLYUBIN, I.; FADEEVA, J. V.; CULLEN, W. K.; ANWYL, R.; WOLFE, M. S.; ROWAN, M. J. e SELKOE, D. J. Naturally secreted oligomers of amyloid  $\beta$  protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. **Nature**, v. 416, p. 535 – 539, 2002.

WIJSMAN, E. M.; DAW, E. W.; YU, C.-E.; PAYAMI, H.; STEINBART, E. J.; NOCHLIN, D.; CONLON, E. M.; BIRD, T. D. e SCHELLENBERG, G. D. Evidence for a Novel Late-Onset Alzheimer Disease Locus on Chromosome 19p13.2. **The American Journal of Human Genetics**, v. 75, n. 3, p. 398 – 409, 2004.

WIMO, A.; GUSTAFSSON, L. e MATTSON, B. Predictive validity of factors influencing the institutionalization of elderly people with psycho-geriatric disorders. **Scandinavian Journal of Primary Health Care**, v. 10, p. 185 - 191, 1992.

YANG, Y.; GELDMACHER, D. S. e HERRUP, K. DNA Replication Precedes Neuronal Cell Death in Alzheimer's Disease. **The Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 8, p. 2661 – 2668, 2001.

YOUNKIN, S. G. The role of A $\beta$  42 in Alzheimer's disease. **Journal of Physiology - Paris**, v. 92, p. 289 – 292, 1998.

ZANA, M.; JANKA, Z. e KÁLMÁN, J. Oxidative stress: A bridge between Down's syndrome and Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 28, p. 648 – 676, 2007.

ZHANG, N.; YU, J.-T.; YANG, Y.; YANG, J.; ZHANG, W. e TAN, L. Association analysis of GSK3B and MAPT polymorphisms with Alzheimer's disease in Han Chinese. **Brain Research**, v. 1391, p. 147 – 155, 2011.

ŽIVKOVIĆ, L.; SPREMO-POTPAREVIĆ, B.; DJELIĆ, N. e BAJIĆ, V. Analysis of premature centromere division (PCD) of the chromosome 18 in peripheral blood lymphocytes in Alzheimer disease patients. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 127, n. 12, p. 892 - 896, 2006.