

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENFERMAGEM
DEPARTAMENTO DE ENFERMAGEM

FERNANDA CAROLINA ROZENDO

**IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO GENE
APOE EM PESSOAS IDOSAS COM QUEIXAS
COGNITIVAS DA CIDADE DE SÃO CARLOS, SP-
BRASIL**

SÃO CARLOS -SP
2023

FERNANDA CAROLINA ROZENDO

**IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO GENE *APOE* EM PESSOAS IDOSAS COM
QUEIXAS COGNITIVAS DA CIDADE DE SÃO CARLOS, SP- BRASIL**

Dissertação, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Enfermagem, ao Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, para obtenção do título de mestre em Ciência da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Francisco de Assis
Carvalho do Vale

Coorientador: Prof. Dr. Anderson
Ferreira da Cunha

São Carlos-SP

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Enfermagem

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Fernanda Carolina Rozendo, realizada em 24/02/2023.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Francisco de Assis Carvalho do Vale (UFSCar)

Profa. Dra. Juliana Hotta Ansai (UFSCar)

Profa. Dra. Mariana Luciano de Almeida (USP)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Enfermagem.

APRESENTAÇÃO

Este presente trabalho será apresentado no formato de artigos científico.

Primeiramente será feita uma breve revisão da literatura relacionada às pesquisas sobre o tema e os objetivos da dissertação. Posteriormente, virá o artigo científico que será composto por introdução, metodologia, resultados, discussão e conclusão. Este formato é uma opção no regulamento para defesa de tese no Programa de Pós-Graduação em Enfermagem (PPGEnf) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Portanto, publicaremos um artigo científico relacionado a este trabalho, intitulados: "IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO GENE APOE EM PESSOAS IDOSAS COM QUEIXAS COGNITIVAS DA CIDADE DE SÃO CARLOS-SP-BRASIL".

DEDICATÓRIA

Dedico este presente trabalho primeiramente a Deus, por ter me abençoado e me guiado em todo esse meu percurso, pois se não fosse por ele não teria chegado até aqui.

Ao meu avô, Romeu (que não se encontra mais neste plano físico), por ter financiado os meus estudos e me apoiado desde sempre, sou muito grata a ele por tudo.

Em especial a minha mãe, Dulcilena, por me dar forças pra nunca desistir dos meus sonhos e metas.

Ao meu pai e meus irmãos pelo apoio e incentivo a nunca desistir.

AGRADECIMENTO

A Deus, primeiro de tudo.

Gratidão ao meu Orientador, Prof. Dr. Francisco de Assis Carvalho do Vale por todos os ensinamentos e me ajudado a amadurecer durante este processo.

Gratidão ao Coorientador: Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha, por ter me recebido tão bem no laboratório e por acreditar em mim e sempre me incentivar a melhorar e sempre mostrar que sou capaz.

Gratidão por serem meus guias e me ensinarem a crescer como pessoa e gratidão pelos seus ensinamentos.

A minha Família LBGA-Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada, por terem me recebido tão bem ao laboratório pois todos tiveram papéis importantes nesta minha trajetória.

Agradeço a todos os integrantes do grupo de Serviço de Neurologia Cognitiva-comportamental da UFSCar (SNC-UFSCar) que participaram da minha caminhada no mestrado, a vocês Carina, Mariana, Ana Claudia e a Carla Nunes por sempre estarem comigo e me dando forças.

Agradeço aos meus pais e meus irmãos por fazerem parte deste percurso.

E a todos os funcionários e professores da instituição.

“Eu faço da dificuldade a minha motivação.

A volta por cima, vem na continuação”.

Charlie Brown J

RESUMO

O crescente envelhecimento da população mundial tem resultado num aumento significativo das doenças crônicas não transmissíveis, incluindo as que causam demência. A queixa de perda de memória no idoso pode manifestar-se inicialmente como (i) declínio cognitivo subjetivo (DCS) ou como (ii) comprometimento cognitivo leve (CCL). A doença de Alzheimer (DA), corresponde por mais da metade dos casos de demências. Existem diversos fatores de risco genéticos associados a DA, sendo o polimorfismo encontrado no gene da Apolipoproteína E (APOE) um dos mais estudados. Neste estudo com uma amostra de 25 idosos com queixas cognitivas da cidade de São Carlos-SP (7 com DA e 18 com queixas cognitivas sem demência), buscou-se identificar polimorfismos no gene APOE que possam estar associados com o desenvolvimento da DA. Dos pacientes com DA, dois apresentaram a isoforma APOE4; no grupo de pacientes com queixa cognitiva sem demência estes polimorfismos não foi encontrada. No entanto, três das pessoas com queixas cognitivas sem demência apresentaram outros polimorfismos já descritos como rs769455 (n=2) e rs557715042 (n=1) no gene APOE. Existem poucos relatos na literatura associando estes dois últimos polimorfismos a DA e nenhum associado a queixas cognitivas sem demência. A identificação destes marcadores pode contribuir para um diagnóstico precoce e auxiliar no desenvolvimento de estratégias de tratamento.

Palavras-Chave: Apolipoproteína E; Polimorfismo; Queixas cognitivas; Demência; Alzheimer.

ABSTRACT

The increasing aging of the world's population has resulted in a significant increase in chronic noncommunicable diseases, including those that cause dementia. The complaint of memory loss in the elderly may initially manifest as (i) subjective cognitive decline (SCD) or as (ii) mild cognitive impairment (MCI). Alzheimer's disease (AD) accounts for more than half of all cases of dementias. There are several genetic risk factors associated with AD, with the polymorphism found in the Apolipoprotein E (APOE) gene being one of the most studied. In this study with a sample of 25 elderly with cognitive complaints from the city of São Carlos-SP (7 with AD and 18 with cognitive complaints without dementia), we sought to identify polymorphisms in the APOE gene that may be associated with the development of AD. Of the patients with AD, two presented the APOE4 isoform; in the group of patients with cognitive complaints without dementia these polymorphisms were not found. However, three of the people with cognitive complaints without dementia had other polymorphisms already described as rs769455 (n=2) and rs557715042 (n=1) in the APOE gene. There are few reports in the literature associating these last two polymorphisms with AD and none associated with cognitive complaints without dementia. Identification of these markers may contribute to early diagnosis and aid in the development of treatment strategies.

Key-words: Apolipoprotein E, Polymorphism, Cognitive complaints, Dementia, Alzheimer's disease

LISTA DE ILUSTRAÇÕES-DISSERTAÇÃO

Figura 1 - Esquema da estrutura do gene APOE localizado no cromossomo 19. 20

LISTA DE ILUSTRAÇÕES-ARTIGO

Figura 1 - Esquema de amplificação da sequência a ser amplificada do gene APOE. 37

Figura 2 - Distribuição da população por gênero, idade e condição clínica. 38

Figura 3 - Análise de integridade e especificidade da amplificação. 39

Figura 4- Identificação de polimorfismos associados ao gene APOE em pacientes com queixas cognitivas. 40

LISTA DE SIGLAS

ADAM10	Metallopeptidase Domain 10,
APOE	Apolipoproteína E
APP	Proteína precursora amiloide
Arg	Arginina
βA	Beta- amiloide
BIN1	Bridging Integrator 1
CCL	Comprometimento Cognitivo Leve
CLU	Clusterin
Cys	Cisteína
DA	Doença de Alzheimer
DCL	Demência de corposde Lewy
DFT	Demência frontotemporal
DCS	Declínio Cognitivo subjetivo
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DVasc	Demência vascular
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
GWAS	Análise ampla do genoma
HDL	Lipoproteínas de alta densidade
HIV	Imunodeficiência humana.
LCR	Líquido Céfalorraquidiano
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	Razões de chances
PICALM	Phosphatidylinositol Binding Clathrin Assembly Protein
PLD3	Fosfolipase D3,
PSEN1	Presenilina 1
PSEN2	Presenilina 2
PET	Tomografia por emissão de pósitrons
SNPs	Polimorfismos de nucleotídeo único
SORL1	Sortilin Related Receptor 1)
SNVs	Variantes de nucleotídeo
TREM2	Receptor desencadeante expresso em células mieloides 2
Trp	Triptofano
VLDL	Lipoproteínas de densidade muito baixa

Sumário

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Embasamento Teórico	13
1.2	Queixas cognitivas	13
1.3	Declínio Cognitivo Subjetivo (DCS)	14
1.4	Comprometimento Cognitivo Leve (CCL)	15
1.5	Demência: Definição e fatores de risco para o seu desenvolvimento	16
1.6	Doença de Alzheimer	17
1.6.1	Genes envolvidos na DA	18
1.7	Apoliproteína E (APOE)	19
1.7.1	Polimorfismos do gene <i>APOE</i>	21
2	JUSTIFICATIVA	23
3	OBJETIVOS	24
3.1	Objetivo Geral	24
4	METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
	REFERÊNCIAS UTILIZADAS NA DISSERTAÇÃO	25
	APÊNDICE A - ARTIGO	32
	Introdução	34
	Metodologia	36
	Desenho de estudo	36
	Critério de inclusão e exclusão	36
	Fator de exposição	36
	Tamanho e amostragem da população de estudo	36
	Procedimentos éticos legais	36
	Análises Moleculares	36
	Resultados	38
	Dados populacionais	38
	Extração de DNA e amplificação dos fragmentos para sequenciamento	39
	Análise de sequenciamento para a identificação de polimorfismos no exon 4 do gene <i>APOE</i>	39
	Discussão	40
	Declaração de disponibilidade de dados	42
	Financiamento	42
	Conflito de Interesse	43
	Contribuição dos Autores	43
	Referências	43

1 INTRODUÇÃO

1.1 Embasamento Teórico

O envelhecimento populacional em nosso país, assim como no resto do mundo, vem aumentando de maneira significativa. De acordo com as estimativas, em 2040 o número de idosos atingirá cerca de 23,8% idosos. Isto se deve, principalmente às mudanças nas taxas de natalidade e mortalidade, alterando a pirâmide etária, além do perfil de morbidade populacional que caracteriza a transição demográfica e epidemiológica do país (DOS SANTOS; DE BESSA; XAVIER, 2020).

Devido ao aumento da expectativa de vida, as doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), têm sido consideradas um grande desafio na saúde pública. Essas doenças provocam um comprometimento na qualidade de vida das pessoas acometidas, como também de seus familiares, além de impactar substancialmente a economia do país, principalmente em função dos gastos com a atividade de cuidar, medicamentos, exames laboratoriais e internações (DOS SANTOS; DE BESSA; XAVIER, 2020; MONTEIRO et al., 2005).

Dentre as DCNT que estão associados com o envelhecimento, encontram-se as que causam demência, que é considerada uma das principais causas de comprometimento funcional e da qualidade de vida do idoso (BALLARD et al., 2011; DOS SANTOS; DE BESSA; XAVIER, 2020). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) no ano de 2012 aproximadamente 35 milhões de pessoas no mundo apresentaram um quadro de demência. Estima-se que até 2050 este número deve aumentar muito, podendo atingir cerca de 115 milhões de habitantes no mundo. (DOS SANTOS; DE BESSA; XAVIER, 2020; ORGANIZATION, 2012).

1.2 Queixas cognitivas

O comprometimento da memória cognitiva é uma das principais preocupações dos idosos (PÉREZ-BLANCO; RODRÍGUEZ-SALGADO, 2022). A presença de queixas cognitivas é um sintoma precoce de comprometimento cognitivo (CHOE et al., 2018; PÉREZ-BLANCO; RODRÍGUEZ-SALGADO, 2022) e é um critério necessário para o diagnóstico de Transtorno Cognitivo Leve ou dos Transtornos neurocognitivos (ALBERT et al., 2011; ASSOCIATION, 2014; PÉREZ-BLANCO;

RODRÍGUEZ-SALGADO, 2022). Embora os problemas cognitivos nem sempre estejam associados a essas condições clínicas, eles fazem parte do processo normal de envelhecimento (GONZÁLEZ-MARTÍNEZ et al., 2021; PÉREZ-BLANCO; RODRÍGUEZ-SALGADO, 2022; PURSER; FILLENBAUM; WALLACE, 2006).

Estudos recentes têm mostrado que a presença de comprometimento cognitivo está associada a fatores de risco psicossociais, como sintomas de depressão e ansiedade. (MARKOVA et al., 2017; MONTEJO et al., 2019; PÉREZ-BLANCO; RODRÍGUEZ-SALGADO, 2022). Além disso, o comprometimento cognitivo pode afetar o trabalho diário e as áreas sociais, tornando-se um importante fator secundário de estresse (FRANKENMOLEN et al., 2018; MASCHEREK et al., 2020; PÉREZ-BLANCO; RODRÍGUEZ-SALGADO, 2022). Esse estresse pode aumentar a percepção de lapsos de memória em pessoas mais velhas, o que, por sua vez, pode aumentar o nível de tensão e mais lapsos percebidos, resultando em um ciclo vicioso de estresse (PÉREZ-BLANCO; RODRÍGUEZ-SALGADO, 2022). Esses dados reforçam a importância de tratá-los para reduzir seu impacto (FARINA et al., 2022; METTERNICH et al., 2010; PÉREZ-BLANCO; RODRÍGUEZ-SALGADO, 2022).

Há evidências crescentes de que os mecanismos do envelhecimento cognitivo são comuns em doenças crônicas relacionadas à idade, como, inflamação e dano celular (FABBRI et al., 2015; HILL et al., 2021). Isso é particularmente evidente em doenças que comprometem a saúde cardiovascular, incluindo aquelas mais comuns entre os idosos, como hipertensão arterial, hiperlipidemia, doença arterial coronariana e diabetes mellitus (HE et al., 2018; HILL et al., 2021). Pessoas com hipertensão e diabetes correm maior risco de declínio cognitivo tardio, comprometimento cognitivo leve (CCL) e DA, e sabe-se que a comorbidades aumentam os risco de declínio cognitivo (HILL et al., 2021; LUCHSINGER et al., 2007; WRIGHTEN et al., 2009).

Adultos mais velhos com maior multimorbidade (ou seja, duas ou mais condições crônicas) estão mais preocupados com o esquecimento percebido (AARTS et al., 2011; HILL et al., 2021). Esta é uma consideração importante porque as queixas cognitivas acompanhadas de preocupação estão associadas a um risco duas vezes a quatro vezes maior de desenvolver DA em comparação com queixas isoladas (F et al., 2010; HILL et al., 2021; WOLFSGRUBER et al., 2016).

1.3 Declínio Cognitivo Subjetivo (DCS)

O DCS é caracterizado como um comprometimento progressivo das funções cognitivas autopercebido em indivíduos cognitivamente normais (VAN HARTEN et al., 2018). Diversos estudos apontam que o DCS pode estar associada a um risco elevado no desenvolvimento do comprometimento cognitivo leve (CCL) ou demência da DA (BUCKLEY et al., 2016; JESSEN et al., 2014a; VAN HARTEN et al., 2018) outros estudos também sugerem que o DCS pode ter uma relação com causas não neurodegenerativas, como sintomas depressivos, ansiedade, certos traços de personalidade ou problemas de saúde física (HILL et al., 2016; VAN HARTEN et al., 2018).

O DCS é considerado um estado entre o comprometimento cognitivo objetivo e a cognição intacta, podendo ser a primeira manifestação sintomática para a DA (JESSEN et al., 2014b; WEN et al., 2021). Estudos apontaram que os indivíduos com DCS têm uma taxa de conversão mais elevada e um tempo de conversão mais curto para CCL e demência do que pessoas cognitivamente intactas (BUCKLEY et al., 2016; MITCHELL et al., 2014; WEN et al., 2021).

Níveis anormais de biomarcadores para DA presentes no líquido cefalorraquidiano, aumento da deposição de beta-amiloide no cérebro demonstrado por tomografia por emissão de pósitrons (PET) e atrofia cerebral demonstrada na ressonância magnética (RNM) também foram observados em indivíduos com DCS (DE ROJAS et al., 2018; VISSER et al., 2009; WEN et al., 2021).

Todas as evidências acima mostram que mais estudos de DCS são de suma importância e podem fornecer pistas importantes para um estágio pré-clínico relacionado à demência ou DA (WEN et al., 2021).

1.4 Comprometimento Cognitivo Leve (CCL)

O declínio cognitivo é um processo biológico comum no processo de envelhecimento, algum grau de desaceleração cognitiva é típico do envelhecimento normal. Muitas vezes o idoso e seus familiares chegam ao consultório clínico com diversas queixas que atribuem “perda de memória”, entretanto sabe-se que essas preocupações podem se referir a uma série de habilidades cognitivas ou ao declínio cognitivo geral, e não apenas à memória. No entanto, mesmo podendo ser associadas ao envelhecimento normal, causam preocupação porque também podem

preenunciar um declínio cognitivo associado a uma demência. (HUGO; GANGULI, 2014).

Com base nestas queixas, é importante identificar primeiramente as alterações cognitivas que são clinicamente significativas. A demência é diagnosticada quando o comprometimento cognitivo se agrava o suficiente para comprometer o funcionamento social e/ou ocupacional. O comprometimento cognitivo leve (CCL) é um estado intermediário entre a cognição normal e a demência, com habilidades funcionais essencialmente preservadas (HUGO; GANGULI, 2014).

Pesquisas relatam que o CCL pode ser revertido para um estado cognitivo normal. A taxa de prevalência é de 3-19% na população idosa, com incidência entre 8 a 58/1.000 pessoas/ano e risco de desenvolver demência de 11-33% em 2 anos (LUGO-TRAMPE; TRUJILLO-MURILLO, 2010)

Em relação aos achados histopatológicos da CCL, um déficit colinérgico central está presente no CCL amnésico, relacionado à perda neuronal no núcleo basal de Meynert (LUGO-TRAMPE; TRUJILLO-MURILLO, 2010). Em estudos post-mortem, foram encontradas evidências de uma regulação positiva na atividade da colinaacetiltransferase no córtex frontal e no hipotálamo (LUGO-TRAMPE; TRUJILLO-MURILLO, 2010; ROSENBERG; JOHNSTON; LYKETSOS, 2006). Há evidências de que condições cerebrovasculares e neurodegenerativas contribuem para o surgimento da CCL, especialmente lesões de substância branca e pequenos infartos lacunares (KELLEY; MINAGAR, 2009; LUGO-TRAMPE; TRUJILLO-MURILLO, 2010; WINBLAD et al., 2004).

O diagnóstico de CCL é importante, pois pode ser uma fase da pré-demência. O CCL pode ser considerado um fator de risco para DA ou mesmo uma fase prodrômica da DA. É essencial definir com precisão os critérios de identificação do paciente, especificamente aqueles que apresentam risco de progressão da doença, cuja condição permanecerá “estável” e cuja função cognitiva reverterá para um estado normal (GIAU; BAGYINSZKY; AN, 2019; PETERSEN, 2016).

1.5 Demência: Definição e fatores de risco para o seu desenvolvimento

Dados recentes mostram que entre 5,9–9,4% das pessoas acima dos 65 anos sofrem de demência, o que significa que existem aproximadamente 44 milhões de

afetados em todo o mundo (PRINCE et al., 2014). Uma das suas principais características é o declínio na memória, especificamente na memória de aprendizagem de novas informações, deterioração no julgamento e pensamento, planejamento e organização e no processamento geral das informações (JONES, 2003).

O envelhecimento é um importante fator de risco para o desenvolvimento de demências dada principalmente pelo aumento da longevidade e sobrevida, associado ao aumento na prevalência de doenças crônicas e morbidade em idades avançadas (FERRI, 2005; GARRE-OLMO, 2018). Diversos fatores estão relacionados a este processo, por exemplo, fatores genéticos e ambientais, que contribuem para sua fisiopatologia (SINFORIANI; COTTA RAMUSINO; COSTA, 2017).

As demências neurodegenerativas são condições clinicamente heterogêneas, progressivas, com sintomas frequentemente sobrepostos, como déficits cognitivos e déficits de comportamento e movimento. Dentre essas, incluem-se a DA, demência vascular (DVasc), demência de corpos de Lewy (DCL), demência frontotemporal (DFT) (HINZ; GESCHWIND, 2017).

Com relação aos fatores genéticos, poucas demências são causadas por genes autossômicos dominantes, mas sim por uma combinação de alterações genéticas que levam ao aparecimento desta condição. Apesar de vários genes terem sido identificados como um fator para a suscetibilidade para a DA, um dos mais bem estabelecido é o polimorfismo da Apolipoproteína E (*APOE*), que é o foco deste trabalho e será discutido em detalhes mais adiante.

1.6 Doença de Alzheimer

A DA é a principal causa de demência na população idosa, afetando aproximadamente 24 milhões de pessoas em todo o mundo (FAKHOURY, 2018; MAYEUX; STERN, 2012). A prevalência de DA aumenta com a idade, com uma prevalência estimada de 1% a 2% da população aos 65 anos, para 15% aos 75 anos e 35% a 50% aos 85 anos e um histórico familiar positivo é observado em cerca de 20% dos casos (GZIL, 2009; HEBERT et al., 2003). Fatores de risco genéticos e ambientais desempenham um papel fundamental na ocorrência da DA (ASSOCIATION, 2019; HUANG X, 2020).

A DA pode ser classificada em duas formas, esporádica e hereditária. A DA familiar hereditária pode ser causada por mutações nos genes da proteína precursora amiloide (APP), presenilina 1 (PSEN1) ou PSEN2. Essas formas familiares raras de DA representam apenas 1% dos casos (DETURE; DICKSON, 2019; RYMAN et al., 2014).

A DA denominada esporádica é a forma mais comum. Diversos fatores de risco genéticos foram identificados, destacando-se os relacionados ao gene da Apolipoproteína E (APOE) (DETURE; DICKSON, 2019; LANE; HARDY; SCHOTT, 2018). Outros fatores de risco para a DA esporádica são os genes TREM2, ADAM10 e PLD3, CLU, SORL1, BIN1 e PICALM (CORDER et al., 1993b; HUANG X, 2020).

Esta doença é caracterizada por três grandes fases: DA pré-clínica, comprometimento cognitivo leve (CCL) devido à DA e demência da DA.

DA pré-clínica: os indivíduos podem apresentar alterações cerebrais que indicam patologia da DA (biomarcadores), mas ainda não desenvolveram sintomas como perdas cognitivas. (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2022).

CCL devido a DA: há evidências de biomarcadores de alterações cerebrais da DA associadas a sintomas cognitivos, porém sem prejuízo funcional (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2022). Cerca de 15% das pessoas com CCL desenvolvem demência após dois anos, aproximadamente um terço delas desenvolve demência da DA dentro de cinco anos. No entanto, alguns indivíduos com CCL voltam à cognição normal ou não apresentam declínio cognitivo adicional. Identificar quais indivíduos com CCL são mais propensos a desenvolver demência é de suma importância (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2022).

Demência por DA: é caracterizada por sintomas perceptíveis de memória, linguagem, pensamento ou comportamento que prejudicam a capacidade em que uma pessoa tem na sua vida diária, combinados a evidências de biomarcadores de alterações cerebrais relacionadas à DA. (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2022). De acordo com o estágio da demência, a DA é classificada em leve, moderada ou avançada. (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2022).

1.6.1 Genes envolvidos na DA

A identificação de novos loci que afetam o risco de DA é importante para compreender as causas etiológicas envolvidas na doença e também na busca por biomarcadores que possam ser utilizados no diagnóstico precoce. Com base nisso, vários estudos associados a análise ampla do genoma (do inglês Genome Wide Association Studies - GWAS) identificaram polimorfismos em vários genes que estão associados ao risco de DA (HAROLD et al., 2009; KARCH; GOATE, 2015).

A identificação de variantes comuns relacionados ao risco desta doença estabeleceu uma imagem mais ampla dos processos e vias envolvidas. Variantes em genes relacionados ao metabolismo lipídico, na resposta inflamatória e na endocitose foram identificadas por meio desses estudos (KARCH; GOATE, 2015; KIM et al., 2009). Apesar de existir um grande conjunto de dados com o genoma completo ou sequenciamento de exoma, foram detectadas evidências de variantes de codificação raras em dois genes com potencial risco de DA tardia: *PLD3* e *TREM2* (KARCH; GOATE, 2015; KIM et al., 2009). Mutações em *PLD3* parecem estar envolvidas na modulação do tamanho dos esferoides axonais e com isso gera importantes defeitos de condução axonal (YUAN et al., 2022). *TREM2*, parece ser uma proteína específica de cérebro e quase exclusivamente expresso na micróglia que exerce funções neuroprotetoras. Dessa forma, estudos mostram que indivíduos com variantes de *TREM2* apresentam risco aumentado de DA uma vez que a função da micróglia fica prejudicada nesses pacientes (CONDELLO; YUAN; GRUTZENDLER, 2018).

Adicionalmente, uma associação que vem sendo demonstrada na literatura como uma das mais promissoras para diagnósticos precoces é a Apolipoproteína E (APOE). A *APOE* é uma proteína reguladora do metabolismo das lipoproteínas e desempenha importantes funções no sistema nervoso central: transporte de colesterol, neuroplasticidade e inflamação (KARCH; GOATE, 2015; KIM; BASAK; HOLTZMAN, 2009). Esta proteína liga-se a β A e influencia na sua depuração e agregação, além de atuar em seu metabolismo (KARCH; GOATE, 2015; KIM; BASAK; HOLTZMAN, 2009). Em camundongos transgênicos alterados em *APP*, o *APOE* influencia a quantidade e a estrutura dos depósitos β A (BALES et al., 1997; KARCH; GOATE, 2015).

1.7 Apolipoproteína E (APOE)

A *APOE* humana é codificada no braço longo do cromossomo 19 (19q13.2)

com aproximadamente 3,7 kb de comprimento e possui quatro éxons e três íntrons e possui (LAWS et al., 2003). (Figura 1)

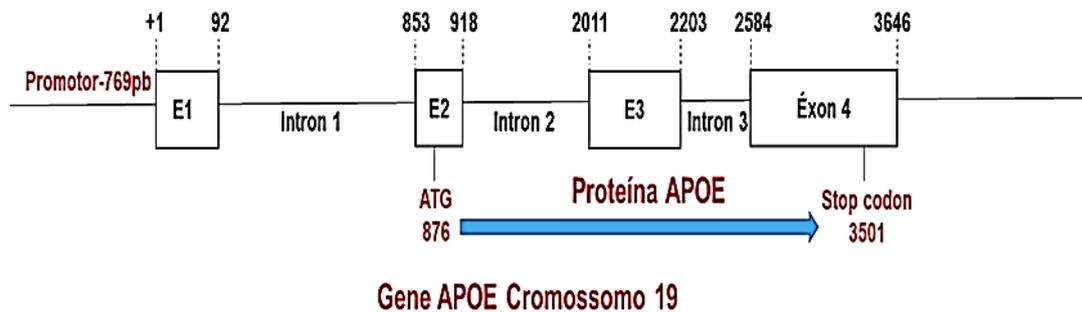


Figura 1. Esquema da estrutura do gene APOE localizado no cromossomo 19. O esquema evidencia a estrutura do gene APOE com seus 4 exons e sua região codificante que se inicia na posição 876 e termina na região 3501 (seta azul clara). Fonte: próprio autor (FCR e AFC)

Estruturalmente, é uma proteína de ~34 kDa, composta por 299 resíduos de aminoácidos e apresenta dois domínios funcionais, domínios N-terminal e C-terminal dobrados independentemente, que são unidos por uma região de dobradiça flexível (BU, 2009; HATTERS; PETERS-LIBEU; WEISGRABER, 2006). A região *APOE* que interage com os receptores de *APOE* está no domínio N-terminal (resíduos 136-150), enquanto a principal região de ligação a lipídios (resíduos 244-272) está dentro do domínio C-terminal (BU, 2009; WEISGRABER; RALL; MAHLEY, 1981).

Sua principal função é o transporte de colesterol e outros lipídios no plasma e no sistema nervoso central (SNC) por meio da ligação aos receptores APOE de superfície celular (BU, 2009; MAHLEY, 1988). Vários órgãos sintetizam APOE, incluindo o fígado, cérebro, baço, pulmão, suprarrenal e rim (DRISCOLL; GETZ, 1984; LAWS et al., 2003).

O fígado é o principal local de expressão da *APOE* e é a fonte de aproximadamente três quartos do seu conteúdo plasmático circulante. No fígado, as células do parênquima hepático são as principais responsáveis por sua produção (LAWS et al., 2003). O cérebro é o segundo órgão com maior produção desta proteína sendo altamente encontrada no LCR, particularmente porque o LCR carece de apoB, outra importante proteína de transporte de colesterol encontrada no plasma (LAWS et al., 2003; MERCHED et al., 1997).

1.7.1 Polimorfismos do gene APOE

Em humanos, o gene APOE existe como três alelos polimórficos diferentes devido à presença de dois SNPs (rs429358 (C > T) e rs7412 (C > T)): APOE2, APOE3 e APOE4 (APOE2, 3 e 4), que geram seis genótipos diferentes (APOE2/2, APOE2/3, APOE2/4, APOE3/3, APOE3/4 e APOE4/4). O APOE3 é o alelo mais frequente encontrado na população (77%) enquanto o alelo APOE2 é o menos comum (8%) (BU, 2009; MAHLEY, 1988).

Com um resíduo Cys na posição 112, tanto a APOE2 quanto APOE3 têm a capacidade de formar heterodímeros e homodímeros ligados por dissulfeto. No entanto, no alelo APOE4, a presença de uma Arg nesta posição, impede significativamente esta ligação (WEISGRABER; SHINTO, 1991; WOLFE et al., 2019). A variação estrutural entre as isoformas devido ao aminoácido Cys/Arg na posição 158 impacta o domínio de ligação ao receptor de APOE e sua afinidade de ligação aos receptores de APOE (WOLFE et al., 2019).

A variação na posição 112 desempenha um papel na interação domínio-domínio e afeta as propriedades de ligação de lipídios de APOE, explicando assim a preferência de ligação de APOE4 para lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) e APOE3 para HDL (WEISGRABER, 1990; WOLFE et al., 2019). Portanto, a estabilidade e o papel funcional da APOE dependem em grande parte de sua capacidade de interagir com lipídios e de suas propriedades de ligação ao receptor (WOLFE et al., 2019).

Em um estudo de meta-análise, com indivíduos afro-americanos, brancos, hispânicos e japoneses, foi demonstrado que a razão de chances (OR) para o desenvolvimento de DA em indivíduos com um alelo de APOE2 é de 0,621 (IC 95% 0,456–0,85) em comparação com indivíduos homocigotos para APOE3. Em contraste, o OR para o desenvolvimento de DA em indivíduos portadores de um alelo APOE4 é de 3,68 (IC 95% 3,30–4,11) em comparação com indivíduos homocigotos para APOE3 (ALZGENE, 2010; YAMAZAKI et al., 2019).

A APOE4 foi então relacionada ao aumento do risco de DA e na diminuição da idade de início da doença de uma maneira dependente do número de alelos (CORDER et al., 1993a; NEU et al., 2017; YAMAZAKI et al., 2019). Um estudo que incluiu >17.000 indivíduos brancos mostraram que os ORs para o desenvolvimento

de DA foram 2,64 e 3,63, respectivamente, em indivíduos com os genótipos *APOE2/4* e *APOE3/4*, em relação à aqueles com o genótipo *APOE3/3* (GENIN et al., 2011; YAMAZAKI et al., 2019). O OR aumentou de forma significativa para 14,49 em indivíduos com o genótipo *APOE4/4* (GENIN et al., 2011; YAMAZAKI et al., 2019).

Além disso, em comparação com os não portadores da *APOE4*, carregar um alelo *APOE4* antecipa o início da DA em 2 a 5 anos, e carregar dois alelos *APOE4* adianta em 5 a 10 anos (CORDER et al., 1993a; SANDO et al., 2008; YAMAZAKI et al., 2019). A frequência alélica média de *APOE4* em indivíduos cognitivamente saudáveis em populações afro-americanas, brancas, hispânicas e japonesas é de 9 a 20% (ALZGENE, 2010; YAMAZAKI et al., 2019); no entanto, é dramaticamente aumentada para ~40% entre pacientes com DA (FARRER et al., 1997; YAMAZAKI et al., 2019), destacando ainda a forte associação da *APOE4* com o risco de DA, um estudo publicado em 2018 mostrou que a prevalência de *APOE4* foi de 66% em indivíduos com demência do tipo DA confirmada por biomarcadores (MATTSSON et al., 2018; YAMAZAKI et al., 2019).

A raça/etnia pode influenciar a magnitude do risco associado ao alelo *APOE4* de desenvolver DA. Por exemplo, quando comparado com indivíduos brancos, a associação de *APOE4* com risco de DA é mais fraca entre indivíduos afro-americanos e hispânicos, mas é mais forte em indivíduos japoneses (FARRER et al., 1997; YAMAZAKI et al., 2019).

Além dos polimorfismos existentes na região codificadora, os polimorfismos na região promotora da *APOE* (para detalhes vide Figura 1), responsáveis por modular a atividade transcricional da região codificadora da *APOE*, também foram relacionados ao risco de desenvolvimento da DA. Estudos de associação de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) no promotor do gene *APOE* em uma população de idosos, identificou a presença de 3 SNPs (491A / T, rs449647; 427T / C, rs769446; 219T / G, rs405509) (SHU et al., 2015). Ficou demonstrado que indivíduos chineses portadores do alelo rs405509 TT tem diminuição na função cognitiva geral, episódios de perda de memória e problemas na fala, independentemente de serem portadores do alelo *APOE4* (CHEN et al., 2015, SHU et al., 2015, CHANG et al., 2017). Nesta população pacientes homocigotos para o polimorfismo rs405509 TT e o alelo *APOE4* mostraram declínio cognitivo evidentes

nos domínios da memória e linguagem (MA et al., 2016).

No entanto, em um outro estudo em uma população de idosos da Finlândia o rs405509 TT foi associado a uma melhora no desempenho cognitivo, como a fala, orientação espacial e aritmética (RANTALAINEN et al., 2016). Estes resultados demonstram que existe uma importante interação entre o polimorfismo rs405509 TT e a raça/etnia de cada população (FAN et al., 2019), levando ao questionamento que diversos polimorfismos no gene *APOE* podem estar relacionados as diferentes populações no mundo. Além da DA outros estudos se propuseram a avaliar a presença de polimorfismos e mutações em pacientes com outros distúrbios cognitivos ao redor do mundo (FAN et al., 2019).

Estudos em populações foram realizados visando correlacionar o genótipo *APOE4* em diferentes pacientes com queixas cognitivas, comparando com pacientes com DA e controles. Os resultados mostraram que presença do alelo *APOE4* foi relacionada a diminuição do desempenho global de cognição e memória em pacientes com CCL, se assemelhando ao perfil de funcionamento cognitivo e mnemônico de pacientes nos estágios iniciais da DA (FARLOW et al., 2004, RAMAKERS et al., 2008, FAN et al., 2019). Estes estudos evidenciam que portadores de CCL com o genótipo *APOE4* tendem a ter um declínio cognitivo mais rápido que os portadores de outros alelos, estando mais sujeitos ao desenvolvimento da DA (WHITEHAIR et al., 2010, FEI and JIANHUA, 2013)

Apesar de alguns estudos realizados com esta proteína em nosso país, a maioria se restringe a uma associação com os alelos já identificados com foco principal no alelo *APOE4* e na maioria em pacientes já com a DA (ALMEIDA and SHIMOKOMAKI, 1997, BAHIA et al., 2008).

Como estudos relacionados a polimorfismos no gene *APOE* em pacientes com queixas cognitivas são escassos na literatura, torna-se importante que novos dados sejam gerados. Este trabalho foi proposto a fim de verificar a presença de polimorfismos novos ou já identificados neste grupo de pacientes.

2 JUSTIFICATIVA

O envelhecimento populacional mundial, inclusive no nosso país, tem resultado num aumento na ocorrência de doenças crônicas não transmissíveis, incluindo as que causam demência e dentre estas destacando-se a DA.

A DA é uma doença de origem poligênica e multifatorial, de natureza neurodegenerativa e início enganoso. O diagnóstico de certeza só é possível quando o exame neuropatológico post mortem mostra a presença de placas amiloides e emaranhados neurofibrilares nos cérebros de pacientes que sofreram dos sintomas clínicos antes de sua morte.

O diagnóstico ante mortem depende de uma soma de critérios clínicos de inclusão e exclusão. Com base nos critérios atuais, o diagnóstico de DA provável é dado quando o paciente tem demência, que é estabelecida como comprometimento cognitivo que envolve pelo menos dois domínios cognitivos e é fortemente grave a ponto de prejudicar a funcionalidade nas atividades da vida diária.

Embora de extrema importância, existem poucos estudos associando o gene *APOE*, evidenciando a necessidade de estudos mais aprofundado. O melhor entendimento da associação da DA com a *APOE*, sua prevalência e seus mecanismos de patogênese se justificam e são de fundamental importância para a melhor compreensão desta doença de amplitude mundial.

Estudos que abordam a relação do gene *APOE* com o DCS e com CCL da DA são necessários e relevantes.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Realizar a análise genética para a identificação de polimorfismos no gene *APOE* em um grupo de idosos com queixas cognitivas sem demência e com DA da cidade de São Carlos.
- Amplificar através da técnica de PCR o éxon 4 do gene *APOE*, utilizando o DNA extraído de leucócitos de indivíduos com queixas cognitivas sem demência e com DA.
- Identificar através da técnica de sequenciamento e comparação com banco de dados, a presença de alterações genéticas no gene *APOE* em pessoas com queixas cognitivas sem demência e com DA.

4 METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Metodologia, os Resultados e a Discussão desse estudo são descritos em um artigo científico submetido ao periódico “Caderno de Saúde” e que está sob revisão. Dessa forma inserimos abaixo o artigo em português na íntegra (Apêndice A).

REFERÊNCIAS UTILIZADAS NA DISSERTAÇÃO

- AARTS, S.; VAN DEN AKKER, M.; HAJEMA, K. J.; VAN INGEN, A. M.; METSEMAKERS, J. F. M.; VERHEY, F. R. J.; VAN BOXTEL, M. P. J. Multimorbidity and its relation to subjective memory complaints in a large general population of older adults. **International psychogeriatrics**, [S. l.], v. 23, n. 4, p. 616–624, 2011. DOI: 10.1017/S1041610210002024. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21044401/>. Acesso em: 8 mar. 2023.
- ALBERT, Marilyn S. et al. The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer’s disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer’s Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer’s disease. **Alzheimer’s & dementia : the journal of the Alzheimer’s Association**, [S. l.], v. 7, n. 3, p. 270–279, 2011. DOI: 10.1016/J.JALZ.2011.03.008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21514249/>. Acesso em: 8 mar. 2023.
- ALZGENE. **Alzgene. Meta-analysis of all published AD association studies (case-control only) APOE_E2/3/4**. 2010. Disponível em: <http://www.alzgene.org/meta.asp?genelD=83>.
- ALZHEIMER’S ASSOCIATION. 2022 Alzheimer’s disease facts and figures. **Alzheimer’s & dementia : the journal of the Alzheimer’s Association**, [S. l.], v. 18, n. 4, p. 700–789, 2022. DOI: 10.1002/ALZ.12638. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35289055/>. Acesso em: 16 jun. 2022.
- ASSOCIATION, Alzheimer’s. 2019 Alzheimer’s disease facts and figures. **Alzheimer’s & Dementia**, [S. l.], v. 15, n. 3, p. 321–387, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2019.01.010>. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2019.01.010>.
- ASSOCIATION, American Psychiatric. DSM-5: Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales. [S. l.], 2014.
- BALES, Kelly R. et al. Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid beta-peptide deposition. **Nature genetics**, [S. l.], v. 17, n. 3, p. 263–264, 1997. DOI: 10.1038/NG1197-263. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9354781/>. Acesso em: 18 dez. 2022.
- BALLARD, Clive; GAUTHIER, Serge; CORBETT, Anne; BRAYNE, Carol; AARSLAND, Dag; JONES, Emma. Alzheimer’s disease. **The Lancet**, [S. l.], v. 377, n. 9770, p. 1019–1031, 2011. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)61349-9.
- BU, Guojun. Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer’s disease: pathways, pathogenesis and therapy. **Nature reviews. Neuroscience**, [S. l.], v. 10, n. 5, p. 333–344, 2009. DOI: 10.1038/nrn2620. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19339974>.
- BUCKLEY, Rachel F. et al. Subjective memory decline predicts greater rates of clinical progression in preclinical Alzheimer’s disease. **Alzheimer’s & dementia : the journal of the Alzheimer’s Association**, [S. l.], v. 12, n. 7, p. 796–804, 2016. DOI:

10.1016/J.JALZ.2015.12.013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26852195/>. Acesso em: 18 nov. 2022.

CHOE, Young Min; BYUN, Min Soo; LEE, Jun Ho; SOHN, Bo Kyung; LEE, Dong Young; KIM, Jee Wook. Subjective memory complaint as a useful tool for the early detection of Alzheimer's disease. **Neuropsychiatric disease and treatment**, [S. l.], v. 14, p. 2451–2460, 2018. DOI: 10.2147/NDT.S174517. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30288043/>. Acesso em: 8 mar. 2023.

CONDELLO, Carlo; YUAN, Peng; GRUTZENDLER, Jaime. Microglia-Mediated Neuroprotection, TREM2, and Alzheimer's Disease: Evidence From Optical Imaging. **Biological Psychiatry**, [S. l.], v. 83, n. 4, p. 377–387, 2018. DOI: 10.1016/J.BIOPSYCH.2017.10.007. Disponível em: <http://www.biologicalpsychiatryjournal.com/article/S0006322317320632/fulltext>. Acesso em: 20 jan. 2023.

CORDER, E. H.; SAUNDERS, A. M.; STRITTMATTER, W. J.; SCHMECHEL, D. E.; GASKELL, P. C.; SMALL, G. W.; ROSES, A. D.; HAINES, J. L.; PERICAK-VANCE, M. A. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. **Science**, [S. l.], v. 261, n. 5123, p. 921–923, 1993. a. DOI: 10.1126/science.8346443. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8346443/>. Acesso em: 16 abr. 2022.

CORDER, E. H.; SAUNDERS, A. M.; STRITTMATTER, W. J.; SCHMECHEL, D. E.; GASKELL, P. C.; SMALL, G. W.; ROSES, A. D.; HAINES, J. L.; PERICAK-VANCE, M. A. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. **Science (New York, N.Y.)**, United States, v. 261, n. 5123, p. 921–923, 1993. b. DOI: 10.1126/science.8346443.

DE ROJAS, Itziar et al. Correlations between plasma and PET beta-amyloid levels in individuals with subjective cognitive decline: The Fundació ACE Healthy Brain Initiative (FACEHBI) 11 Medical and Health Sciences 1109 Neurosciences. **Alzheimer's Research and Therapy**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 1–12, 2018. DOI: 10.1186/S13195-018-0444-1/FIGURES/2. Disponível em: <https://alzres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13195-018-0444-1>. Acesso em: 18 nov. 2022.

DETURE, Michael A.; DICKSON, Dennis W. **The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. Molecular Neurodegeneration** BioMed Central Ltd., , 2019. DOI: 10.1186/s13024-019-0333-5.

DOS SANTOS, Camila de Souza; DE BESSA, Thaíssa Araujo; XAVIER, André Junqueira. Factors associated with dementia in elderly. **Ciencia & saude coletiva**, [S. l.], v. 25, n. 2, p. 603–611, 2020. DOI: 10.1590/1413-81232020252.02042018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32022200/>. Acesso em: 23 nov. 2022.

DRISCOLL, D. M.; GETZ, G. S. Extrahepatic synthesis of apolipoprotein E. **Journal of lipid research**, United States, v. 25, n. 12, p. 1368–1379, 1984.

F, Jessen et al. Prediction of dementia by subjective memory impairment: effects of severity and temporal association with cognitive impairment. **Archives of general psychiatry**, [S. l.], v. 67, n. 4, p. 414, 2010. DOI: 10.1001/ARCHGENPSYCHIATRY.2010.30. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20368517/>. Acesso em: 8 mar. 2023.

FABBRI, Elisa; ZOLI, Marco; GONZALEZ-FREIRE, Marta; SALIVE, Marcel E.; STUDENSKI, Stephanie A.; FERRUCCI, Luigi. Aging and Multimorbidity: New Tasks, Priorities, and Frontiers for Integrated Gerontological and Clinical Research. **Journal of the American Medical Directors Association**, [S. l.], v. 16, n. 8, p. 640–647, 2015. DOI: 10.1016/J.JAMDA.2015.03.013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25958334/>.

Acesso em: 8 mar. 2023.

FAKHOURY, Marc. Microglia and Astrocytes in Alzheimer's Disease: Implications for Therapy. **Current neuropharmacology**, [S. l.], v. 16, n. 5, p. 508–518, 2018. DOI: 10.2174/1570159X15666170720095240.

FARINA, F. R.; BENNETT, M.; GRIFFITH, J. W.; LENAERT, B. Fear of memory loss predicts increased memory failures and lower quality of life in older adults: preliminary findings from a fear-avoidance of memory loss (FAM) scale. **Aging & mental health**, [S. l.], v. 26, n. 3, p. 486–492, 2022. DOI: 10.1080/13607863.2020.1856780. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33291990/>. Acesso em: 8 mar. 2023.

FARRER, L. A. et al. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. **JAMA**, United States, v. 278, n. 16, p. 1349–1356, 1997.

FERRI, C. Global prevalence of dementia. **Lancet -London-**, [S. l.], v. 1, n. 9503, p. 2112–2117, 2005.

FRANKENMOLEN, Nikita L.; OVERDORP, Eduard J.; FASOTTI, Luciano; CLAASSEN, Jurgen A. H. R.; KESSELS, Roy P. C.; OOSTERMAN, Joukje M. Memory Strategy Training in Older Adults with Subjective Memory Complaints: A Randomized Controlled Trial. **Journal of the International Neuropsychological Society : JINS**, [S. l.], v. 24, n. 10, p. 1110–1120, 2018. DOI: 10.1017/S1355617718000619. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30168408/>. Acesso em: 8 mar. 2023.

GARRE-OLMO, J. [Epidemiology of Alzheimer's disease and other dementias]. **Revista de neurologia**, Spain, v. 66, n. 11, p. 377–386, 2018.

GENIN, E. et al. APOE and Alzheimer disease: a major gene with semi-dominant inheritance. **Molecular psychiatry**, [S. l.], v. 16, n. 9, p. 903–907, 2011. DOI: 10.1038/MP.2011.52. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21556001/>. Acesso em: 16 abr. 2022.

GIAU, Vo Van; BAGYINSZKY, Eva; AN, Seong Soo A. Potential Fluid Biomarkers for the Diagnosis of Mild Cognitive Impairment. **International journal of molecular sciences**, [S. l.], v. 20, n. 17, p. 4149, 2019. DOI: 10.3390/ijms20174149.

GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, Patricia; OLTRA-CUCARELLA, Javier; SITGES-MACIÁ, Esther; BONETE-LÓPEZ, Beatriz. [Review and update of the criteria for objective cognitive impairment and its involvement in mild cognitive impairment and dementia]. **Revista de neurologia**, [S. l.], v. 72, n. 8, p. 288–295, 2021. DOI: 10.33588/RN.7208.2020626. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33851718/>. Acesso em: 8 mar. 2023.

GZIL, Fabrice. Alzheimer's disease: psychiatric or neurological disorder? **Poiesis & Praxis**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 13–26, 2009.

HAROLD, Denise et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. **Nature genetics**, [S. l.], v. 41, n. 10, p. 1088–1093, 2009. DOI: 10.1038/NG.440. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19734902/>. Acesso em: 18 dez. 2022.

HATTERS, Danny M.; PETERS-LIBEU, Clare A.; WEISGRABER, Karl H. **Apolipoprotein E structure: insights into function**. **Trends in Biochemical Sciences**, 2006. DOI: 10.1016/j.tibs.2006.06.008.

HE, Zhe; BIAN, Jiang; CARRETTA, Henry J.; LEE, Jiwon; HOGAN, William R.; SHENKMAN, Elizabeth; CHARNESS, Neil. Prevalence of Multiple Chronic Conditions Among Older Adults in Florida and the United States: Comparative Analysis of the OneFlorida Data Trust and National Inpatient Sample. **Journal of medical Internet**

research, [S. l.], v. 20, n. 4, 2018. DOI: 10.2196/JMIR.8961. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29650502/>. Acesso em: 8 mar. 2023.

HEBERT, Liesi E.; SCHERR, Paul A.; BIENIAS, Julia L.; BENNETT, David A.; EVANS, Denis A. Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census. **Archives of neurology**, United States, v. 60, n. 8, p. 1119–1122, 2003. DOI: 10.1001/archneur.60.8.1119.

HILL, Nikki L.; BHARGAVA, Sakshi; BROWN, Monique J.; KIM6, Hyejin; BHANG, Iris; MULLIN, Kaitlyn; PHILLIPS, Kathleen; MOGLE, Jacqueline. Cognitive complaints in age-related chronic conditions: A systematic review. **PloS one**, [S. l.], v. 16, n. 7, 2021. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0253795. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34234373/>. Acesso em: 8 mar. 2023.

HILL, Nikki L.; MOGLE, Jacqueline; WION, Rachel; MUNOZ, Elizabeth; DEPASQUALE, Nicole; YEVCHAK, Andrea M.; PARISI, Jeanine M. Subjective Cognitive Impairment and Affective Symptoms: A Systematic Review. **The Gerontologist**, [S. l.], v. 56, n. 6, p. e109, 2016. DOI: 10.1093/GERONT/GNW091. Disponível em: </pmc/articles/PMC5181393/>. Acesso em: 18 nov. 2022.

HUANG X. **Alzheimer's Disease: Drug Discovery**. [s.l.] : Exon Publications, 2020. DOI: 10.36255/exonpublications.alzheimersdisease.2020.

HUGO, Julie; GANGULI, Mary. Dementia and cognitive impairment: epidemiology, diagnosis, and treatment. **Clinics in geriatric medicine**, [S. l.], v. 30, n. 3, p. 421–442, 2014. DOI: 10.1016/j.cger.2014.04.001.

JESSEN, Frank et al. A conceptual framework for research on subjective cognitive decline in preclinical Alzheimer's disease. **Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association**, [S. l.], v. 10, n. 6, p. 844, 2014. a. DOI: 10.1016/J.JALZ.2014.01.001. Disponível em: </pmc/articles/PMC4317324/>. Acesso em: 18 nov. 2022.

JESSEN, Frank et al. A conceptual framework for research on subjective cognitive decline in preclinical Alzheimer's disease. **Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association**, [S. l.], v. 10, n. 6, p. 844, 2014. b. DOI: 10.1016/J.JALZ.2014.01.001. Disponível em: </pmc/articles/PMC4317324/>. Acesso em: 18 nov. 2022.

JONES, Roy W. The dementias. **Clinical medicine (London, England)**, [S. l.], v. 3, n. 5, p. 404–408, 2003. DOI: 10.7861/clinmedicine.3-5-404.

KARCH, Celeste M.; GOATE, Alison M. Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis. **Biological psychiatry**, [S. l.], v. 77, n. 1, p. 43, 2015. DOI: 10.1016/J.BIOPSYCH.2014.05.006. Disponível em: </pmc/articles/PMC4234692/>. Acesso em: 18 dez. 2022.

KELLEY, Roger E.; MINAGAR, Alireza. Memory complaints and dementia. **The Medical clinics of North America**, United States, v. 93, n. 2, p. 389–406, ix, 2009. DOI: 10.1016/j.mcna.2008.09.008.

KIM, Jungsu; BASAK, Jacob M.; HOLTZMAN, David M. The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. **Neuron**, [S. l.], v. 63, n. 3, p. 287–303, 2009. DOI: 10.1016/J.NEURON.2009.06.026. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19679070/>. Acesso em: 18 dez. 2022.

KIM, Minji et al. Potential late-onset Alzheimer's disease-associated mutations in the ADAM10 gene attenuate {alpha}-secretase activity. **Human molecular genetics**, [S. l.], v. 18, n. 20, p. 3987–3996, 2009. DOI: 10.1093/HMG/DDP323. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19608551/>. Acesso em: 18 dez. 2022.

LANE, C. A.; HARDY, J.; SCHOTT, J. M. Alzheimer's disease. **European Journal of Neurology**, [S. l.], v. 25, n. 1, p. 59–70, 2018. DOI: 10.1111/ENE.13439. Acesso em: 6 mar.

2022.

LAWS, Simon M.; HONE, Eugene; GANDY, Sam; MARTINS, Ralph N. Expanding the association between the APOE gene and the risk of Alzheimer's disease: possible roles for APOE promoter polymorphisms and alterations in APOE transcription. *Alzheimer's & Dementia*, mar. 2003, 6, p. 1215–1236.

LUCHSINGER, José A.; REITZ, Christiane; PATEL, Bindu; TANG, Ming Xin; MANLY, Jennifer J.; MAYEUX, Richard. Relation of diabetes to mild cognitive impairment. **Archives of neurology**, [S. l.], v. 64, n. 4, p. 570–575, 2007. DOI: 10.1001/ARCHNEUR.64.4.570. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17420320/>. Acesso em: 8 mar. 2023.

LUGO-TRAMPE, Ángel; TRUJILLO-MURILLO, Karina Del Carmen. Medicina Universitaria. **Medicina**, [S. l.], v. 12, n. 54, p. 187–192, 2010.

MAHLEY, Robert W. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. **Science (New York, N.Y.)**, [S. l.], v. 240, n. 4852, p. 622–630, 1988. DOI: 10.1126/SCIENCE.3283935. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3283935/>. Acesso em: 10 mar. 2022.

MARKOVA, Hana; ANDEL, Ross; STEPANKOVA, Hana; KOPECEK, Miloslav; NIKOLAI, Tomas; HORT, Jakub; THOMAS-ANTÉRION, Catherine; VYHNALEK, Martin. Subjective Cognitive Complaints in Cognitively Healthy Older Adults and Their Relationship to Cognitive Performance and Depressive Symptoms. **Journal of Alzheimer's disease : JAD**, [S. l.], v. 59, n. 3, p. 871–881, 2017. DOI: 10.3233/JAD-160970. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28697555/>. Acesso em: 8 mar. 2023.

MASCHEREK, Anna; WERKLE, Nathalie; GÖRITZ, Anja S.; KÜHN, Simone; MORITZ, Steffen. Lifestyle Variables Do Not Predict Subjective Memory Performance Over and Above Depression and Anxiety. **Frontiers in psychology**, [S. l.], v. 11, 2020. DOI: 10.3389/FPSYG.2020.00484. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32265791/>. Acesso em: 8 mar. 2023.

MATTSSON, Niklas et al. Prevalence of the apolipoprotein E ϵ 4 allele in amyloid β positive subjects across the spectrum of Alzheimer's disease. **Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association**, [S. l.], v. 14, n. 7, p. 913–924, 2018. DOI: 10.1016/J.JALZ.2018.02.009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29601787/>. Acesso em: 16 abr. 2022.

MAYEUX, Richard; STERN, Yaakov. Epidemiology of Alzheimer disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, [S. l.], v. 2, n. 8, 2012. DOI: 10.1101/cshperspect.a006239.

METTERNICH, B.; KOSCH, D.; KRISTON, L.; HÄRTER, M.; HÜLL, M. The effects of nonpharmacological interventions on subjective memory complaints: a systematic review and meta-analysis. **Psychotherapy and psychosomatics**, [S. l.], v. 79, n. 1, p. 6–19, 2010. DOI: 10.1159/000254901. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19887887/>. Acesso em: 8 mar. 2023.

MITCHELL, A. J.; BEAUMONT, H.; FERGUSON, D.; YADEGARFAR, M.; STUBBS, B. Risk of dementia and mild cognitive impairment in older people with subjective memory complaints: meta-analysis. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, [S. l.], v. 130, n. 6, p. 439–451, 2014. DOI: 10.1111/ACPS.12336. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/acps.12336>. Acesso em: 18 nov. 2022.

MONTEIRO, Carlos Augusto; MOURA, Eryl Catarina De; JAIME, Patrícia Constante; LUCCA, Alessandra; FLORINDO, Alex Antonio; FIGUEIREDO, Iramaia Campos Ribeiro; BERNAL, Regina; SILVA, Nilza Nunes Da. Monitoramento de fatores de risco para doenças crônicas por entrevistas telefônicas. **Revista de Saúde Pública**, [S. l.], v. 39, n. 1, p. 47–57,

2005. DOI: 10.1590/s0034-89102005000100007.

MONTEJO, Pedro; MONTENEGRO-PEÑA, Mercedes; PRADA, David; GARCÍA-MULERO, Encarnación; GARCÍA-MARÍN, Antonio; PEDRERO PÉREZ, Eduardo J. [Memory complaints: mental health, diseases, pain and loneliness. A population study in the city of Madrid]. **Revista de neurologia**, [S. l.], v. 69, n. 12, p. 481–491, 2019. DOI: 10.33588/RN.6912.2019252. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31820817/>. Acesso em: 8 mar. 2023.

NEU, Scott C. et al. Apolipoprotein E Genotype and Sex Risk Factors for Alzheimer Disease: A Meta-analysis. **JAMA neurology**, [S. l.], v. 74, n. 10, p. 1178–1189, 2017. DOI: 10.1001/JAMANEUROL.2017.2188. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28846757/>. Acesso em: 16 abr. 2022.

ORGANIZATION, World Health. **Dementia: a public health priority**. Geneva PP - Geneva: World Health Organization, 2012. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/75263>.

PÉREZ-BLANCO, Lucía; RODRÍGUEZ-SALGADO, Dolores. Neuropsychological approach to subjective cognitive complaints in cognitively unimpaired older people: A systematic review. **International journal of geriatric psychiatry**, [S. l.], v. 37, n. 6, 2022. DOI: 10.1002/GPS.5728. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35607814/>. Acesso em: 8 mar. 2023.

PETERSEN, Ronald C. Mild Cognitive Impairment. **Continuum (Minneapolis, Minn.)**, [S. l.], v. 22, n. 2 Dementia, p. 404–418, 2016. DOI: 10.1212/CON.0000000000000313.

PRINCE, Martin; ALBANESE, Emiliano; GUERCHET, Maëlen; PRINA, Matthew. World Alzheimer Report 2014 Dementia and Risk Reduction An Analysis of pRotective AnD moDifiAble fActoRs EXECUTIVE SUMMARY dr Maëlen Guerchet dr Matthew prina. [S. l.], 2014. Disponível em: www.daviddesigns.co.uk.

PURSER, Jama L.; FILLENBAUM, Gerda G.; WALLACE, Robert B. Memory complaint is not necessary for diagnosis of mild cognitive impairment and does not predict 10-year trajectories of functional disability, word recall, or short portable mental status questionnaire limitations. **Journal of the American Geriatrics Society**, [S. l.], v. 54, n. 2, p. 335–338, 2006. DOI: 10.1111/J.1532-5415.2005.00589.X. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16460388/>. Acesso em: 8 mar. 2023.

ROSENBERG, Paul B.; JOHNSTON, Deirdre; LYKETSOS, Constantine G. A clinical approach to mild cognitive impairment. **The American journal of psychiatry**, United States, v. 163, n. 11, p. 1884–1890, 2006. DOI: 10.1176/ajp.2006.163.11.1884.

RYMAN, Davis C. et al. Symptom onset in autosomal dominant Alzheimer disease: a systematic review and meta-analysis. **Neurology**, [S. l.], v. 83, n. 3, p. 253–260, 2014. DOI: 10.1212/WNL.0000000000000596. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24928124/>. Acesso em: 6 mar. 2022.

SANDO, Sigrid B.; MELQUIST, Stacey; CANNON, Ashley; HUTTON, Michael L.; SLETVOLD, Olav; SALTVEDT, Ingvild; WHITE, Linda R.; LYDERSEN, Stian; AASLY, Jan O. APOE epsilon 4 lowers age at onset and is a high risk factor for Alzheimer’s disease; a case control study from central Norway. **BMC neurology**, [S. l.], v. 8, 2008. DOI: 10.1186/1471-2377-8-9. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18416843/>. Acesso em: 16 abr. 2022.

SINFORIANI, E.; COTTA RAMUSINO, Matteo; COSTA, Alfredo. **Rethinking dementias. Functional neurology**, 2017. DOI: 10.11138/fneur/2017.32.3.117.

VAN HARTEN, Argonde C.; MIELKE, Michelle M.; SWENSON-DRAVIS, Dana M.; HAGEN, Clinton E.; EDWARDS, Kelly K.; ROBERTS, Rosebud O.; GEDA, Yonas E.; KNOPMAN,

David S.; PETERSEN, Ronald C. Subjective cognitive decline and risk of MCI: The Mayo Clinic Study of Aging. **Neurology**, [S. l.], v. 91, n. 4, p. e300–e312, 2018. DOI: 10.1212/WNL.0000000000005863. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29959257/>. Acesso em: 18 nov. 2022.

VISSER, Pieter Jelle et al. Prevalence and prognostic value of CSF markers of Alzheimer's disease pathology in patients with subjective cognitive impairment or mild cognitive impairment in the DESCRIPA study: a prospective cohort study. **The Lancet Neurology**, [S. l.], v. 8, n. 7, p. 619–627, 2009. DOI: 10.1016/S1474-4422(09)70139-5. Disponível em: <http://www.thelancet.com/article/S1474442209701395/fulltext>. Acesso em: 18 nov. 2022.

WEISGRABER, K. H. Apolipoprotein E distribution among human plasma lipoproteins: Role of the cysteine-arginine interchange at residue 112. **Journal of Lipid Research**, [S. l.], v. 31, n. 8, p. 1503–1511, 1990. DOI: 10.1016/s0022-2275(20)42621-5.

WEISGRABER, K. H.; RALL, S. C.; MAHLEY, R. W. Human E apoprotein heterogeneity. Cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo-E isoforms. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 256, n. 17, p. 9077–9083, 1981. DOI: 10.1016/s0021-9258(19)52510-8.

WEN, Chen; HU, Hao; OU, Ya Nan; BI, Yan Lin; MA, Ya Hui; TAN, Lan; YU, Jin Tai. Risk factors for subjective cognitive decline: the CABLE study. **Translational Psychiatry**, [S. l.], v. 11, n. 1, 2021. DOI: 10.1038/S41398-021-01711-1. Disponível em: </pmc/articles/PMC8578345/>. Acesso em: 18 nov. 2022.

WINBLAD, B. et al. Mild cognitive impairment--beyond controversies, towards a consensus: report of the International Working Group on Mild Cognitive Impairment. **Journal of internal medicine**, England, v. 256, n. 3, p. 240–246, 2004. DOI: 10.1111/j.1365-2796.2004.01380.x.

WOLFE, Cody M.; FITZ, Nicholas F.; NAM, Kyong Nyon; LEFTEROV, Iliya; KOLDAMOVA, Radosveta. The Role of APOE and TREM2 in Alzheimer's Disease—Current Understanding and Perspectives. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 20, n. 1, 2019. DOI: 10.3390/IJMS20010081. Disponível em: </pmc/articles/PMC6337314/>. Acesso em: 15 jun. 2022.

WOLFSGRUBER, Steffen et al. Differential Risk of Incident Alzheimer's Disease Dementia in Stable Versus Unstable Patterns of Subjective Cognitive Decline. **Journal of Alzheimer's disease : JAD**, [S. l.], v. 54, n. 3, p. 1135–1146, 2016. DOI: 10.3233/JAD-160407. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27567852/>. Acesso em: 8 mar. 2023.

WRIGHTEN, Shayna A.; PIROLI, Gerardo G.; GRILLO, Claudia A.; REAGAN, Lawrence P. A look inside the diabetic brain: Contributors to diabetes-induced brain aging. **Biochimica et biophysica acta**, [S. l.], v. 1792, n. 5, p. 444–453, 2009. DOI: 10.1016/J.BBADIS.2008.10.013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19022375/>. Acesso em: 8 mar. 2023.

YAMAZAKI, Yu; ZHAO, Na; CAULFIELD, Thomas R.; LIU, Chia-Chen Chen; BU, Guojun. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: pathobiology and targeting strategies. **Nature Reviews Neurology**, [S. l.], v. 15, n. 9, p. 501–518, 2019. DOI: 10.1038/s41582-019-0228-7. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41582-019-0228-7>.

YUAN, Peng; ZHANG, Mengyang; TONG, Lei; MORSE, Thomas M.; MCDOUGAL, Robert A.; DING, Hui; CHAN, Diane; CAI, Yifei; GRUTZENDLER, Jaime. PLD3 affects axonal spheroids and network defects in Alzheimer's disease. **Nature** 2022 612:7939, [S. l.], v. 612, n. 7939, p. 328–337, 2022. DOI: 10.1038/s41586-022-05491-6. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41586-022-05491-6>. Acesso em: 20 jan. 2023.

APÊNDICE A - ARTIGO

Identificação de Polimorfismos no gene *APOE* em pacientes idosos com queixas cognitivas sem demência da cidade de São Carlos-SP-Brazil

Fernanda Carolina Rozendo¹, Carla Nunes Fonseca Fernandes¹, Jéssica Bonomo², Anderson Ferreira Cunha², Francisco Assis Carvalho Vale³

¹ Programa de Pós-graduação em Enfermagem (PPGEnf), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil

² Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada, Departamento de Genética e Evolução, Programa de Pós-graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular (PPGGEv), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, BR

³ Departamento de Medicina, Programa de Pós-graduação em Enfermagem (PPGEnf), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil

***Correspondence:**

Francisco Assis Carvalho Vale- facvale@gmail.com

Palavra-Chave: Apolipoproteína E, Polimorfismo, Queixas cognitivas, Demência, Alzheimer

RESUMO

O crescente envelhecimento da população mundial tem resultado num aumento significativo das doenças crônicas não transmissíveis, incluindo as que causam demência. A queixa de perda de memória no idoso pode manifestar-se inicialmente como (i) declínio cognitivo subjetivo (DCS) ou como (ii) comprometimento cognitivo leve (CCL). A doença de Alzheimer (DA), corresponde por mais da metade dos casos de demências. Existem diversos fatores de risco genéticos associados a DA, sendo o polimorfismo encontrado no gene da Apolipoproteína E (*APOE*) um dos mais estudados. Neste estudo com uma amostra de 25 pessoas idosas com queixas cognitivas da cidade de São Carlos-SP (7 com DA e 18 com queixas cognitivas sem demência), buscou-se identificar polimorfismos no gene *APOE* que possam estar associados com o desenvolvimento da DA. Das pessoas idosas com DA, dois apresentaram a isoforma *APOE4*; no grupo de pessoas idosas com queixa cognitiva sem demência este polimorfismo não foi encontrada. No entanto, três das pessoas idosas com queixas cognitivas sem demência apresentaram outros polimorfismos já descritos como rs769455 (n=2) e rs557715042 (n=1) no gene *APOE*. Existem poucos relatos na literatura associando estes dois últimos polimorfismos a DA e nenhum associado a queixas cognitivas sem demência. A identificação destes marcadores pode contribuir para um diagnóstico precoce e auxiliar no desenvolvimento de estratégias de tratamento.

Introdução

Em 2040, o número de idosos atingirá cerca de 23,85% na população brasileira. Isso se deve, principalmente às mudanças nas taxas de natalidade e mortalidade, alterando a pirâmide etária. Essas doenças provocam um comprometimento na qualidade de vida das pessoas acometidas, como também de seus familiares. Dentre as doenças que estão associadas com o envelhecimento, encontram-se as que causam demência, que é considerada uma das principais causas de comprometimento funcional e qualidade de vida do idoso.^{1,2} Diversos estudos apontam que o Declínio Cognitivo Subjetivo (DCS) pode estar associada a um risco elevado no desenvolvimento do comprometimento cognitivo leve (CCL) ou demência da DA³⁻⁵

Dados recentes mostram que entre 5,9–9,4% das pessoas acima dos 65 anos sofrem de demência, o que significa que existem aproximadamente 44 milhões de afetados em todo o mundo⁶. A DA é a principal causa de demência na população idosa, afetando aproximadamente 24 milhões de pessoas em todo o mundo^{7,8}. A prevalência de DA aumenta com a idade, com uma prevalência estimada de 1% a 2% da população aos 65 anos, para 15% aos 75 anos e 35% a 50% aos 85 anos e um histórico familiar positivo é observado em cerca de 20% dos casos^{9,10}. A doença de Alzheimer é caracterizada por comprometimento cognitivo grave, como perda de memória e comprometimento da linguagem¹³. Fatores de risco

genéticos e ambientais desempenham um papel fundamental na ocorrência da DA^{11,12}. A identificação de novos loci que afetam o risco de DA é importante para compreender as causas etiológicas envolvidas na doença e também na busca por biomarcadores que possam ser utilizados no diagnóstico precoce. Com base nisso, vários estudos associados a análise ampla do genoma (do inglês *Genome Wide Association Studies* - GWAS) identificaram polimorfismos em vários genes que estão associados ao risco de DA^{14,15}. Dentre os genes estudado o gene *APOE* mostrou ser um fator de risco para DA^{14,15}.

A *APOE* humana é uma importante Glicoproteína carreadora de colesterol no cérebro. O gene que codifica para esta proteína está localizado no braço longo do cromossomo 19 (19q13.2). Sua principal função é transporte de colesterol e outros lipídios no plasma e no sistema nervoso central (SNC) por meio da ligação aos receptores *APOE* de superfície celular. Nesta proteína, a presença de dois SNPs (rs429358 (C > T) e rs7412 (C > T) são responsáveis pelos 3 principais alelos conhecidos: *APOE2*, *APOE3* e *APOE4*, sendo que o polimorfismo *APOE4* em homozigose pode representar um fator de risco associado a esta doença. Adicionalmente, polimorfismos neste gene parecem também estar associados a um aumento do risco de perda de memória devido a razões que permanecem desconhecidas^{16,17}.

Além dos polimorfismos existentes na região codificadora, os polimorfismos na região promotora da *APOE*, responsáveis por modular a atividade transcricional da região codificadora da *APOE*, também foram relacionados ao risco de desenvolvimento da DA. Estudos de associação de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) no promotor do gene *APOE* em uma população de idosos, identificou a presença de 3 SNPs (491A / T, rs449647; 427T / C, rs769446; 219T / G, rs405509) (SHU *et al.*, 2015). Ficou demonstrado que indivíduos chineses portadores do alelo rs405509 TT tem diminuição na função cognitiva geral, episódios de perda de memória e problemas na fala, independentemente de serem portadores do alelo *APOE4*¹⁸⁻²⁰. Nesta população pacientes homozigotos para o polimorfismo rs405509 TT e o alelo *APOE4* mostraram declínio cognitivo evidentes nos domínios da memória e linguagem²¹.

No entanto, em um outro estudo em uma população de idosos da Finlândia o rs405509 TT foi associado a uma melhora no desempenho cognitivo, como a fala, orientação espacial e aritmética²². Estes resultados demonstram que existe uma importante interação entre o polimorfismo rs405509 TT e a raça/etnia de cada população²³. Dessa forma, torna-se importante entender a relação entre a presença destes polimorfismos, bem como da identificação de novas mutações no gene *APOE* em populações com queixas cognitivas e sua possível relação com a DA ou de outras alterações neuronais. Neste trabalho, realizamos a análise genética para a identificação de polimorfismos no gene *APOE* em um grupo de pessoas idosas com queixas cognitivas e com DA da cidade de São Carlos.

Metodologia

Desenho de estudo

O estudo foi desenvolvido no Centro de Convivência do Idoso Vera Lúcia Pila e outras Unidades Básicas de São Carlos, São Paulo, no período de novembro de 2019 a dezembro de 2020. Todas as análises genéticas foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada do departamento de Genética e Evolução da UFSCar.

Critério de inclusão e exclusão

Foram selecionadas pessoas idosas de ambos os sexos e com idades igual ou superior a 60 anos, de forma totalmente voluntária. Foram excluídos deste estudo, indivíduos com idade inferior a 60 anos.

Fator de exposição

A queixa cognitiva é considerada o fator de exposição para este estudo.

Tamanho e amostragem da população de estudo

Foram estudados no total 25 idosos acima dos 60 anos. Dezoito com queixas cognitivas foram recrutados do Centro de convivência do idoso Vera Lúcia Pila e Unidades Básicas de Saúde de São Carlos, SP, Brasil e 7 com DA, oriundos do Laboratório de Biologia do Envelhecimento (LABEN), da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

Procedimentos éticos legais

Todas as etapas deste trabalho estão de acordo com as diretrizes das resoluções do Conselho Nacional de Saúde N.466 de 12/12/2012 e N.251 de 07/08/97. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de São Carlos (autorização CAAE:34297414.5.0000.5504). Os participantes foram apresentados ao projeto de pesquisa por meio do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados em duas vias, sendo que uma via fica com o próprio participante e o outro com a pesquisadora.

Análises Moleculares

Material biológico

Foram coletados 5mL de sangue de cada indivíduo em um tubo contendo EDTA (ácido etilenodiamino tetracético) e mantido sobre resfriamento até o momento da sua extração de DNA.

Separação de leucócitos e extração do DNA

Para a separação dos leucócitos, as amostras de sangue foram misturadas com tampão de lise ($\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_4\text{HCO}_3$), seguidas de centrifugação e duas lavagens com PBS1X. Os leucócitos foram então lisados com tampão TKM1 (Tampão TRIS-HCL (1M pH 8), MgCl (5 mM), EDTA (0,5 M, pH 8,0) e Triton (0.1%) e centrifugadas por 5 minutos a 1600g, desprezando o sobrenadante. O pellet foi então ressuspensionado em TKM2 (TKM1 adicionado de NaCl 5M), e após a adição de 25 μL de SDS 10% e incubado a 55°C por 45 minutos. A esta solução foram adicionados 800 μL uma solução fenol:clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1). O DNA foi extraído por precipitação da fase aquosa com 10% do volume do sobrenadante de Acetato de sódio 3M pH 5,2 e etanol absoluto e após uma lavagem com etanol 70% o pellet foi ressuspensionado em 80 μl de água estéril.

Desenho de iniciadores necessários para a amplificação do éxon 4 do gene *APOE*

Os iniciadores para amplificação da região do éxon 4 do gene *APOE* foram desenhados com base na sequência depositada no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI). Tal desenho objetivou à amplificação de um fragmento que abrangesse todo o éxon 4 que é uma região com alta incidência de mutação e onde se encontram os três alelos polimórficos do gene *APOE* (*APOE2*, *APOE3* e *APOE4*). As sequências utilizadas neste trabalho foram *APOE-F* (5'GAACTGGAGGAACAACACTGACC3') e *APOE-R* (5'CTTCGGCGTTCAGTGATTGT3') e estão esquematizadas na Figura 1 e amplificam um fragmento de 680 pbs,.

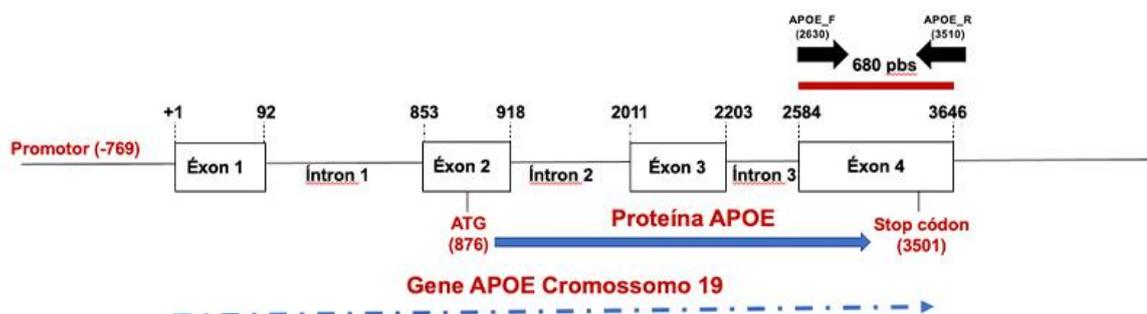


Figura 1. Esquema de amplificação da sequência a ser amplificada do gene *APOE*.

Reação em Cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento

As amplificações foram conduzidas utilizando 10pMol de cada primer, 200 ng de DNA e 2X master mix Cellco (Cellco #POL-102XS) em uma reação final de 25 μL utilizando o seguinte ciclo: desnaturação inicial de 95°/5min; 35 ciclos de 95°/30 seg, 60°/40 seg e 72°/50 seg, seguido de uma extensão final de 72°/5min. As amplificações foram avaliadas através de eletroforese em gel de agarose 1% corada com brometo de etídeo e visualizadas em luz

ultravioleta. As amostras foram então purificadas utilizando o protocolo PEG e enviados para sequenciamento utilizando a metodologia de Sanger em uma empresa terceirizada (Macro-gen - Coréia do Sul).

Análise para a detecção de mutações

As análises para a identificação das possíveis mutações foram realizadas utilizando ferramentas de bioinformática disponibilizadas pelo banco de dados do NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> e Ensembl <https://www.ensembl.org/index.html>. As ferramentas de bioinformática BLASTN (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), Bioedit e Finch TV (<https://digitalworldbiology.com/FinchTV>) também foram usadas para a comparação das sequências obtidas por sequenciamento.

Resultados

Dados populacionais

O grupo de estudo foi agrupados como sujeitos com queixas cognitivas (n=18) e DA (n=7). Em relação a distribuição por sexo, temos 18 do sexo feminino e sete do sexo masculino. Estes indivíduos tinham idades entre 64 a 98 anos, sendo 36% (n= 09) entre 64-74 anos; 32% (n=08) entre 74-84 anos; 28% (n=07) entre 84-94 anos e 4% (n=1) acima de 94 anos. A figura 2 apresenta um resumo dos dados amostrais.

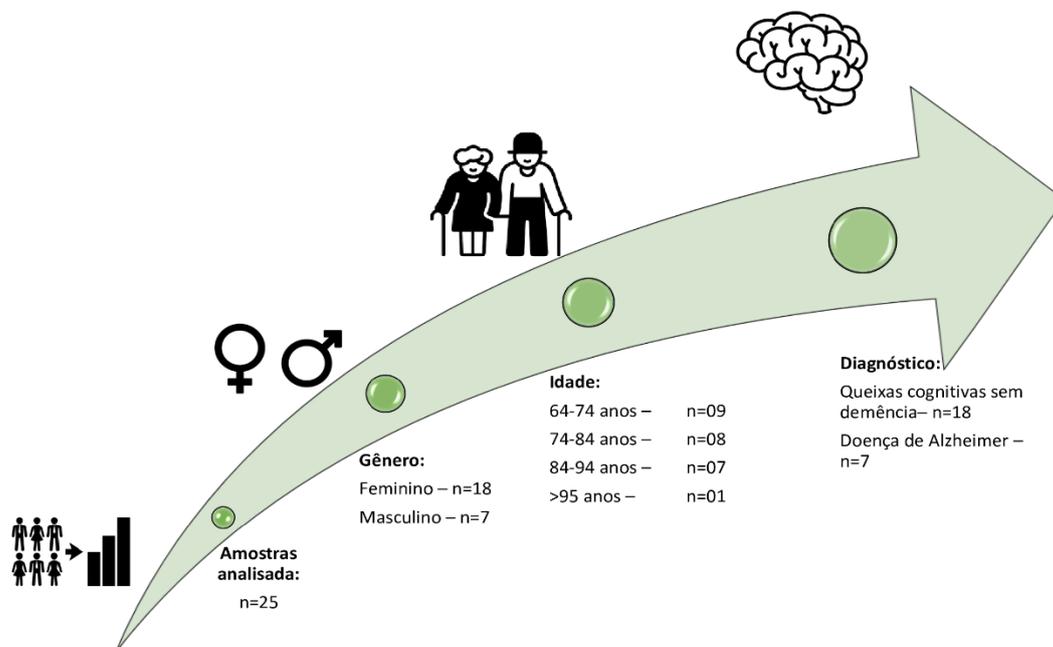


Figura 2. Distribuição da população por gênero, idade e condição clínica.

Extração de DNA e amplificação dos fragmentos para sequenciamento

Após extração de DNA de leucócitos, todas as amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro NanoVue (GE-Healthcare) e tiveram sua integridade avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. A Figura 3 mostra o resultado para algumas das amostras de DNA extraídas. A presença de um fragmento de alto peso molecular evidencia a integridade do DNA (Fig. 3A). Todas as extrações foram avaliadas e só foram utilizadas se estivessem de acordo com o esperado. Em seguida foi realizada a amplificação do fragmento de interesse para posterior purificação e sequenciamento. A Figura 3B evidencia a amplificação de um fragmento de 680 pbs conforme esperado.

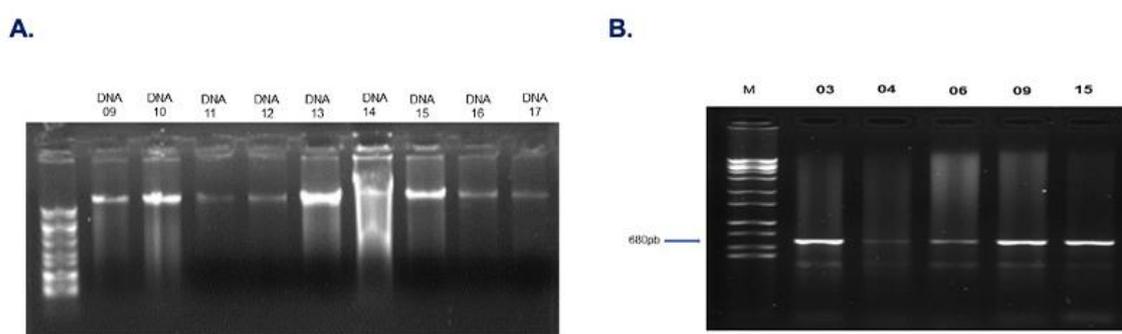


Figura 3. Análise de integridade e especificidade da amplificação.

Análise de sequenciamento para a identificação de polimorfismos no exon 4 do gene *APOE*

Os fragmentos amplificados foram purificados e após sequenciamento foram analisados utilizando os programas BIOEDIT e Finch TV para a remoção de sequências de baixa qualidade. A comparação entre as sequências foi realizada através da ferramenta BLAST-N utilizando como sequência comparativa a sequência original (selvagem) depositada neste banco. Na população com queixas cognitivas, foram identificadas mutações em 03 pessoas idosas, sendo 02 com SNP identificado como rs769455 (C>T) e 1 com o SNP rs557715042 (G>A>T) (Figura 4). Todos os indivíduos idosos deste grupo, inclusive os com a mutação identificada, não apresentaram alterações referente às mutações rs7412 e rs429358 definindo-os como genótipo *APOE3/APOE3*. Nas pessoas idosas com DA, as mutações identificadas foram

relacionadas apenas as mutações rs7412 e rs429358 que identificam os genótipos APOE2, 3 e 4. Neste grupo tivemos os genótipos *APOE3/APOE3* identificados em 4 pessoas idosas enquanto os outros 3 indivíduos foram genotipados como *APOE2/3*, *APOE2/4* e *APOE3/4*.

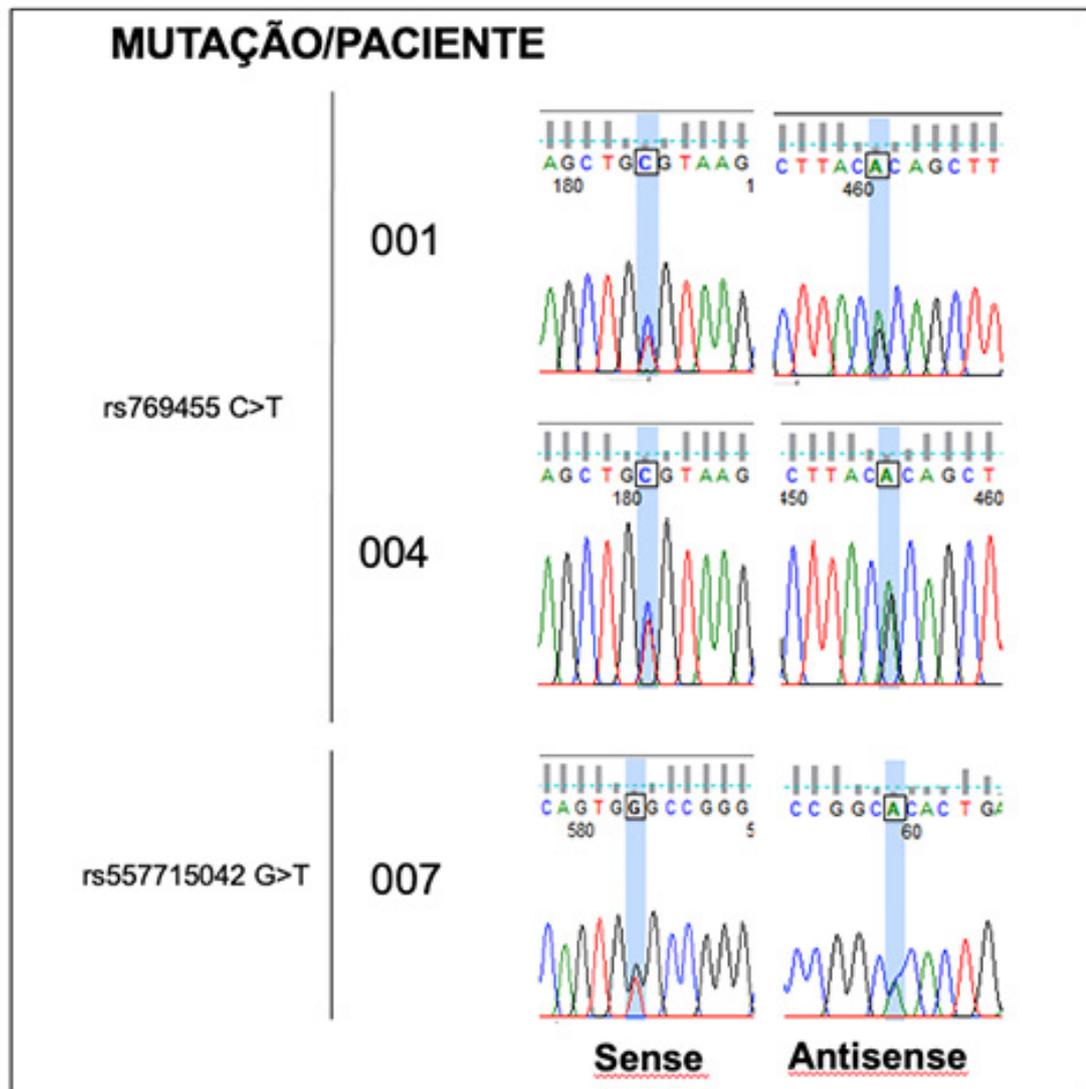


Figura 4. Identificação de polimorfismos associados ao gene *APOE* em pacientes com queixas cognitivas. A mutação rs769455 (C>T) foi identificada em 02 pacientes (001 e 004) e o SNP rs557715042 (G>T) identificada apenas no paciente 007.

Discussão

No presente trabalho, avaliamos a presença de novos polimorfismos no gene *APOE* em um grupo de idosos com queixas cognitivas e com DA da cidade de São Carlos.

A *APOE* é a principal apolipoproteína dos quilomícrons e possui três isoformas²⁴. Essas isoformas ocorrem por polimorfismos, que podem alterar sua função, em duas posições diferentes dentro de regiões codificantes do gene da *APOE*. Muitos estudos de associação

moleculares concentram-se no estudo de SNPs encontrados em regiões codificantes, visando uma associação significativa entre SNPs e suscetibilidade à doença ^{25,26}. Em relação ao *APOE*, a maioria dos estudos de associação, concentram-se na identificação das isoformas *APOE2-4*, no entanto, a presença de outras mutações neste gene, podem também ter influências até então desconhecidas ²⁴. Dessa forma, torna-se importante identificá-las para tentar estabelecer alguma associação que possam levar ao diagnóstico precoce de modo a auxiliar no prognóstico da população idosa.

Nossos resultados mostraram a identificação do rs7969455 em duas pessoas idosas e do rs557715042 em apenas 1, sendo ambos em heterozigose e apenas no grupo de queixas cognitivas. Estudos que relacionam as variantes rs7969455 e rs557715042 com déficits cognitivos e mesmo com a DA, são escassos na literatura ^{27,28}. Isto, portanto, evidencia a necessidade de estudos populacionais mais aprofundados afim de verificar se estas variantes sozinhas ou em conjunto com outras, podem estar associadas ao desenvolvimento de condições mais graves da doença.

O SNP rs769455 é caracterizado pela substituição de uma Citosina por uma Timina que promove a troca de uma Arginina (R) por uma Cisteína (C) na posição 163 (R163C, pArg163Cys) da proteína. Essa alteração que faz com que ocorra a mudança de um aminoácido de alto peso molecular e de característica básica (R) para peso molecular médio e característica polar (C), podendo, portanto, alterar a conformação dessa proteína. Medway et al., fizeram um estudo para a identificação de polimorfismos em *APOE* em 3.955 indivíduos com DA comparando com 4.590 controles sadios. O SNP rs769455 foi identificado em heterozigose em apenas 4 pacientes e 1 controle. Neste estudo nenhum homozigoto foi encontrado demonstrando que este é um alelo raro nesta população. Quando a população foi subdividida de acordo com sua ascendência, identificou-se que a variante rs769455 era mais presente em afro-americanos (1,39%) em comparação com europeus-americanos (0,023%) ²⁸.

Esses autores^{27,28} revelam que o SNP rs769455 teve uma incidência quatro vezes maior em casos de DA europeus-americanos vs. controles evidenciando que a análise mais aprofundada desta alteração é necessária para avaliar sua contribuição potencial para o risco de desenvolvimento da DA ^{27,28}. Apesar disso, nossos dados demonstraram uma alta frequência desta variante (11% - 2 indivíduos em 18 pacientes estudados) na população com queixas cognitivas. Em concordância com a literatura, todos os indivíduos genotipados para esta variante eram heterozigotos. Esses resultados indicam uma maior prevalência dessa variante nesta população. De acordo com os descritos por Medway et al., a raça/etnia parece ter uma importante influência na presença desta variante ²⁷. Portanto, a maior prevalência desta variante nesta população poderia ser explicada pela alta miscigenação encontrada na população brasileira. Estudos longitudinais mais aprofundados e com um maior número de

indivíduos devem ser realizados para comprovar essa hipótese.

Usando simulações de dinâmica molecular, Pires et al, avaliaram o impacto dos SNPs missense do gene *APOE* em alterações estruturais potencialmente deletérias²⁴. Das mutações analisadas, o rs557715042, que em nossos dados foi encontrado em um indivíduo idoso com queixas cognitivas, apresentaram resultados interessantes. Estes autores demonstraram que esta mutação está presente em sítios conservados da proteína e que pode estar relacionada a diminuição nas ligações de hidrogênio entre os domínios C Terminal (CT) e N Terminal (NT). Esta alteração poderia, portanto, interferir na interação lipídica mediada pelo domínio CT, causando perda de afinidade e alterando o comportamento da *APOE*^{24,29}.

Esses estudos demonstram, portanto, que o estudo de SNPs e seus efeitos em conjunto com outras variantes é de suma importância para melhor entender os fatores de risco que podem levar ao desenvolvimento de doenças. No Brasil, existem poucos estudos dessa natureza evidenciando a importância de se conhecer melhor essa população que é bastante miscigenada.

Este trabalho tem limitações importantes quanto ao número de indivíduos avaliados. Durante o processo de seleção dos participantes, fomos prejudicados pela pandemia da COVID-19, impossibilitando dar continuidade ao recrutamento e acompanhamento destes indivíduos. Devido a isto, obtivemos um tamanho amostral relativamente pequeno. Portanto, todas as análises aqui apresentadas, devem ser consideradas estritamente descritivas e geradoras de hipóteses, mas não confirmatórias.

Essa é a primeira vez na literatura que estes polimorfismos são identificados em pacientes com queixas cognitivas. Nossos resultados, além de inéditos, contribuem para o melhor conhecimento molecular e genético desta proteína. Estudos e um acompanhamento mais aprofundados nesta população podem evidenciar uma associação desses SNPs no gene *APOE* como um possível fator de risco para o desenvolvimento da DA.

Em conclusão a amplificação e sequenciamento do éxon 4 do gene *APOE* foi realizada com sucesso. A análise deste sequenciamento identificou 2 SNPs em 3 indivíduos, todos pertencentes ao grupo com queixas cognitivas, a variante rs769455 foi identificada em 2 indivíduos do sexo feminino, a variante rs557715042 foi identificada em 1 indivíduo do sexo feminino. Estudos como estes são necessários para uma melhor compreensão de como os mecanismos genéticos pode influenciar na DA.

Declaração de disponibilidade de dados

Todos os dados apresentados neste estudo estão incluídos no artigo

Financiamento

Este estudo teve financiamento pela CAPES - código de financiamento 001.

Conflito de Interesse

A pesquisa foi realizada na ausência de qualquer relação comercial ou financeira.

Contribuição dos Autores

Carla Nunes Fonseca Fernandes e Fernanda Carolina Rozendo, Jéssica Bonomo, Anderson Ferreira da Cunha e Francisco Assis Carvalho Vale: Conceito e desenho do estudo, análise e interpretação dos dados e preparação da escrita do manuscrito, Francisco de Assis Carvalho do Vale e Anderson Ferreira da Cunha: Revisão Crítica.

Referências

1. Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E. Alzheimer's disease. *The Lancet*. 2011;377(9770):1019-1031. doi:10.1016/S0140-6736(10)61349-9
2. dos Santos C de S, de Bessa TA, Xavier AJ. Factors associated with dementia in elderly. *Cien Saude Colet*. 2020;25(2):603-611. doi:10.1590/1413-81232020252.02042018
3. van Harten AC, Mielke MM, Swenson-Dravis DM, et al. Subjective cognitive decline and risk of MCI: The Mayo Clinic Study of Aging. *Neurology*. 2018;91(4):e300-e312. doi:10.1212/WNL.0000000000005863
4. Jessen F, Amariglio RE, van Boxtel M, et al. A conceptual framework for research on subjective cognitive decline in preclinical Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2014;10(6):844. doi:10.1016/J.JALZ.2014.01.001
5. Buckley RF, Maruff P, Ames D, et al. Subjective memory decline predicts greater rates of clinical progression in preclinical Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2016;12(7):796-804. doi:10.1016/J.JALZ.2015.12.013
6. Prince M, Albanese E, Guerchet M, Prina M. World Alzheimer Report 2014 Dementia and Risk Reduction An Analysis of pRotective AnD moDifiAble fActoRs EXECUTIVE SUMMARY dr Maëleñn Guerchet dr Matthew prina. Published online 2014. www.daviddesigns.co.uk
7. Fakhoury M. Microglia and Astrocytes in Alzheimer's Disease: Implications for Therapy. *Curr Neuropharmacol*. 2018;16(5):508-518. doi:10.2174/1570159X15666170720095240
8. Mayeux R, Stern Y. Epidemiology of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(8). doi:10.1101/cshperspect.a006239
9. Gzil F. Alzheimer's disease: psychiatric or neurological disorder? *Poiesis & Praxis*. 2009;6(1):13-26.
10. Hebert LE, Scherr PA, Bienias JL, Bennett DA, Evans DA. Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census. *Arch Neurol*. 2003;60(8):1119-1122. doi:10.1001/archneur.60.8.1119
11. Huang X. *Alzheimer's Disease: Drug Discovery*. Exon Publications; 2020. doi:10.36255/exonpublications.alzheimersdisease.2020
12. Association A. 2019 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*. 2019;15(3):321-387. doi:https://doi.org/10.1016/j.jalz.2019.01.010

13. Alzheimer's Association. 2022 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement.* 2022;18(4):700-789. doi:10.1002/ALZ.12638
14. Karch CM, Goate AM. Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis. *Biol Psychiatry.* 2015;77(1):43. doi:10.1016/J.BIOPSYCH.2014.05.006
15. Harold D, Abraham R, Hollingworth P, et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 2009;41(10):1088-1093. doi:10.1038/NG.440
16. Belloy ME, Napolioni V, Greicius MD. A Quarter Century of APOE and Alzheimer's Disease: Progress to Date and the Path Forward. *Neuron.* 2019;101(5):820-838. doi:10.1016/j.neuron.2019.01.056
17. Vergheze PB, Castellano JM, Holtzman DM. Apolipoprotein E in Alzheimer's disease and other neurological disorders. *Lancet Neurol.* 2011;10(3):241-252. doi:10.1016/S1474-4422(10)70325-2
18. Shu N, Li X, Ma C, et al. Effects of APOE promoter polymorphism on the topological organization of brain structural connectome in nondemented elderly. *Hum Brain Mapp.* 2015;36(12):4847-4858. doi:10.1002/hbm.22954
19. Chen Y, Li P, Gu B, et al. The effects of an APOE promoter polymorphism on human cortical morphology during nondemented aging. *J Neurosci.* 2015;35(4):1423-1431. doi:10.1523/JNEUROSCI.1946-14.2015
20. Chang P, Li X, Ma C, et al. The Effects of an APOE Promoter Polymorphism on Human White Matter Connectivity during Non-Demented Aging. *J Alzheimers Dis.* 2017;55(1):77-87. doi:10.3233/JAD-160447
21. Ma C, Zhang Y, Li X, et al. Is there a significant interaction effect between apolipoprotein E rs405509 T/T and ϵ 4 genotypes on cognitive impairment and gray matter volume? *Eur J Neurol.* 2016;23(9):1415-1425. doi:10.1111/ene.13052
22. Rantalainen V, Lahti J, Henriksson M, et al. APOE and aging-related cognitive change in a longitudinal cohort of men. *Neurobiol Aging.* 2016;44:151-158. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2016.04.024
23. Fan J, Tao W, Li X, et al. The contribution of genetic factors to cognitive impairment and dementia: Apolipoprotein E gene, gene interactions, and polygenic risk. *Int J Mol Sci.* 2019;20(5):1-31. doi:10.3390/ijms20051177
24. Pires AS, Porto WF, Franco OL, Alencar SA. In silico analyses of deleterious missense SNPs of human apolipoprotein E3. *Sci Rep.* 2017;7(1):2509. doi:10.1038/s41598-017-01737-w
25. Masoodi TA, Al Shammari SA, Al-Muammar MN, Alhamdan AA. Screening and Evaluation of Deleterious SNPs in APOE Gene of Alzheimer's Disease. *Neurol Res Int.* 2012;2012:480609. doi:10.1155/2012/480609
26. Johnson MM, Houck J, Chen C. Screening for deleterious nonsynonymous single-nucleotide polymorphisms in genes involved in steroid hormone metabolism and response. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention.* 2005;14(5):1326-1329.
27. Blue EE, Bis JC, Dorschner MO, et al. Genetic Variation in Genes Underlying Diverse Dementias May Explain a Small Proportion of Cases in the Alzheimer's Disease Sequencing Project. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2018;45(1-2):1-17. doi:10.1159/000485503
28. Medway CW, Abdul-Hay S, Mims T, et al. ApoE variant p.V236E is associated with markedly reduced risk of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener.* 2014;9:11. doi:10.1186/1750-1326-9-11
29. Poirier J. Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. A role in amyloid catabolism. *Ann*

