

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Flávia Lanna de Moraes

**ESTUDO DOS POLIMORFISMOS DOS GENES CLU E CR1 NA
DEPRESSÃO E NA DEMÊNCIA DE ALZHEIMER DE INÍCIO
TARDIO EM IDOSOS BRASILEIROS**

Orientador: Prof. Rodrigo Nicolato

Co-Orientadora: Prof^a. Débora Marques de Miranda

Belo Horizonte

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Flávia Lanna de Moraes

**ESTUDO DOS POLIMORFISMOS DOS GENES CLU E
CR1 NA DEPRESSÃO E NA DEMÊNCIA DE ALZHEIMER
DE INÍCIO TARDIO EM IDOSOS BRASILEIROS**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de mestre junto ao Programa de Pós-graduação em Medicina Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientador: Prof. Rodrigo Nicolato

Co-Orientadora: Prof^a. Débora Marques de Miranda

Belo Horizonte

2012

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar força e persistência para continuar e levar a término meu objetivo.

A meus pais, Sérgio e Zélia, pelo amor, ensinamentos e oportunidades que me proporcionaram.

Às minhas avós nonagenárias, Conceição e Maria, exemplos de envelhecimento bem sucedido.

Aos meus filhos Rachel, David e Sarah, pelo carinho e por abdicarem, compreensivamente, de minha presença em diversas situações e eventos importantes. Rachel, por assumir várias tarefas da casa, liberando-me para dedicação exclusiva a este trabalho. David, pela ajuda na digitação dos dados a “preços módicos”. E Sarah que, apesar de seus 4 anos, soube demandar minha atenção na dose certa.

Ao Edgar, inseparável e inestimável companheiro, pelo carinho, dedicação, estímulo frequente e apoio incondicional que foram peças chaves para o sucesso deste trabalho, além das madrugadas em claro, no “leva e traz” ao laboratório e na reta final.

À Soninha, por cuidar da casa e de nós, proporcionando todas as condições necessárias para a manutenção da rotina de nossas vidas, e também pelas saborosas “guloseimas”, recheadas de carinho, que tornavam os intervalos tão restauradores.

À Rogis, pelo carinho, estímulo e pelo ombro amigo, sempre presente nos momentos de desânimo e na árdua tarefa de conferência de dados.

Ao Guigo, pelo carinho e por abdicar da companhia da Rogis, por uma “boa causa”.

Aos amigos que fiz no laboratório, pelo carinho, por me ensinarem os primeiros passos dos experimentos, esclarecerem dúvidas, ajudarem nas análises...

Karen, pelo estímulo constante desde o início, quando estudou comigo as técnicas dos experimentos, na preparação para a seleção do mestrado. Ao longo do tempo, esteve sempre presente, com todo carinho e total disponibilidade.

Dani e Lu por me ensinarem os primeiros PCRs. A Lu ainda me economizou um tempo precioso com as dicas que me deu para as análises finais.

Geise, Paty e Simone, por atuarem como as iniciais de seus nomes, *GPS*, “localizadoras” de discentes perdidos, sempre disponíveis para orientar e esclarecer as dúvidas.

Ao Antônio, pelo apoio solidário de quem está na mesma fase do mestrado, enfrentando as mesmas dificuldades. Agora no final, nosso “bate e volta” de e-mails, foi muito importante e esclareceu diversas dúvidas. Estou torcendo por você!

Ao Magno e ao Vítor, pelo acervo bibliográfico de genética.

Ao Lafaiete, também contemporâneo de mestrado, pelo apoio, estímulo e parceria na pós-graduação e no Jenny.

Ao Marcus, pelo estímulo e simpatia, já reconhecidos em homenagem na formatura de graduação.

Cinthinha, Soraya, Prika, Luíza, Mauro, Nancy, as alunas Jemima e Isadora e tantos outros... Muito obrigada!

À Cidinha, por ter estimulado minha entrada no laboratório, pela construção do banco de dados e pela ajuda final.

À Raquel, enfermeira da Geriatria, pelo estímulo, amizade e torcida. Por ter oferecido um treinamento em coleta de sangue para mim e meus colegas de laboratório.

À Maura, pela amizade incondicional, pelo estímulo, apoio, carinho e pela vibração a cada conquista.

À Susana, pela amizade, apoio, carinho e por ter “segurado as pontas” na interface entre o Centro Mais Vida e a PBH, nos muitos momentos em que precisei estar no laboratório, realizando os experimentos.

À minha gerente Carmem e minha supervisora Maria, por organizarem minha agenda de forma que eu ficasse liberada para me dedicar exclusivamente a este trabalho em sua fase final. Sem esta ajuda, seria impossível terminar!

À Débora, que assumiu papel de orientadora desde o início, pela paciência, serenidade, competência e disponibilidade em todos os momentos. Por conduzir essa tarefa, de forma tão sábia e equilibrada, dando a liberdade necessária para a aquisição da autonomia indispensável na formação do pesquisador.

Ao Rodrigo Nicolato, presente que recebi na reta final, mas que, em dois meses de orientação, conseguiu ter um envolvimento digno de dois anos. As sugestões finais mesclaram conhecimento científico com “psicoterapia breve”.

Aos professores Marco Aurélio Romano-Silva e Luiz Armando De Marco, por formalizarem a parceria entre o INCT de Medicina Molecular e o Núcleo de Geriatria e Gerontologia da UFMG, fortalecendo a integração entre pesquisa e assistência, fundamentais para o progresso científico.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A demência e a depressão representam causas importantes de dependência e incapacidade entre os idosos, com profundas consequências para a família e o sistema de saúde. O estudo dos biomarcadores é fundamental para a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos da doença e, conseqüentemente, para o diagnóstico precoce e busca de novos alvos terapêuticos. O objetivo do estudo foi avaliar a existência de associação entre os polimorfismos do gene da *Clusterin* (*CLU*) e do Receptor 1 do Complemento (*CR1*) e demência e depressão em idosos brasileiros. O estudo foi observacional e transversal, com 501 indivíduos com idade acima de 60 anos, separados em três grupos distintos: controle (108 indivíduos), demência de Alzheimer (211 indivíduos) e depressão maior (182 indivíduos), que foram comparados com relação aos dados sócio-demográficos, variáveis clínicas e polimorfismos genéticos. A média de idade foi de 78 anos, 80 anos e 76 anos nos grupos controle, demência de Alzheimer e depressão respectivamente. Em todos os grupos, houve predomínio do sexo feminino e a escolaridade variou de 3 a 4,2 anos. A média do MEEM foi de 13 pontos (Demência de Alzheimer), 23 pontos (Depressão) e 26 pontos (Controle). O estudo encontrou uma associação de risco para a doença de Alzheimer entre o alelo ancestral C ($OR=1,52$; $p=0,01$) e o genótipo C/C ($OR=2$; $p=0,02$) para o *rs2279590* do gene codificador da *Clusterin* (*CLU*). A análise haplotípica para os SNPs da *CLU* (*rs22790590* e *rs9331888*) mostrou uma associação entre o haplótipo C-C e o risco para DA, por ter sido encontrado com maior frequência nos casos ($OR 1,23$; $p=0,02$). Por sua vez, o haplótipo C-T foi significativamente mais frequente nos controles ($OR 0,77$; $p=0,03$), sugerindo um efeito protetor. Todavia, estas associações não foram mantidas após o ajustamento com 1.000 permutações, o que se deveu, possivelmente, ao tamanho da amostra. Não houve associação alélica, nem genotípica, entre o SNP *rs9331888* da *CLU* e o SNP *rs6656401* do *CR1* com a doença de Alzheimer. Para depressão, não houve associação com nenhuma dos biomarcadores genéticos avaliados. O estudo reforça a hipótese da associação entre o polimorfismo do gene da *Clusterin* (*CLU*) e o risco para o desenvolvimento da doença de Alzheimer.

ABSTRACT

Dementia and depression are important causes of dependence and disability among the elderly, with severe consequences for the family and health care system. Study of biomarkers is essential to understand pathophysiology of the disease, early diagnosis and search of new therapeutic targets. The aim of this study was to detect any association between polymorphisms of the *Clusterin (CLU)* and the *Complement Receptor 1 (CR1)* genes and AD or depression in Brazilian elderly. It was a cross-section case-control study, with 501 individuals over 60 years, divided in three groups: 211 late-onset Alzheimer's disease (LOAD) patients (women 135; mean age 80 years), 182 major depression individuals (women 148; mean age 76 years) and 108 control subjects (women 75; mean age 78 years). The mean score at MMSE test was 13 points (Alzheimer's disease), 23 points (depression) and 26 points (Control). All analyzed polymorphisms satisfied the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE). Two common genetic variants (*rs 2279590 and rs9331888*) in the *CLU* gene and one (*rs 6656401*) in *CR1* gene were genotyped using TaqMan® technology. The ancestral allele (C) and the genotype (C/C) of the *rs2279590* polymorphism within *CLU* were significantly associated with an increased risk of LOAD ($OR = 1,52$; $p = 0.01$ and $OR = 2$; $p = 0.02$, respectively). Haplotype analysis identified a risk haplotype (C/C) ($OR= 1.23$, $p = 0.02$) and a protective haplotype (C-T) ($OR 0.77$, $p = 0.03$). However, after adjustment, such associations were not maintained, possibly, due to the sample size or ethnic difference, as no other similar study in Brazilian population was published until now. No association between polymorphism of the *CR1* gene were found for LOAD or major depression in our sample. These findings suggest *CLU* as a susceptibility gene for LOAD in a sample of Brazilian population. Larger genetic studies would be needed in the future, to further investigate those genes function and to clarify their functional roles in Alzheimer's disease.

LISTA DE FIGURAS		Página
Figura 1	Sintomatologia depressiva mais frequente no idoso	19
Figura 2	História natural do transtorno depressivo maior	20
Figura 3	Fisiopatologia da doença de Alzheimer	30
Figura 4	Fluxograma de seleção dos indivíduos para o estudo.	40
Figura 5	Resultado de PCR em tempo real	47
Figura 6	Desequilíbrio de Ligação entre dois SNPs	54

LISTA DE QUADROS		Página
Quadro 1	Genes associados com a doença de Alzheimer de início precoce e tardio	29

LISTA DE TABELAS		Página
Tabela 1	Escala de Depressão Geriátrica – 15 pontos (GDS-15)	23
Tabela 2	Bateria de testes cognitivos e de transtornos psiquiátricos utilizada nos Centros de Atenção ao Idoso	42
Tabela 3	Sondas dos polimorfismos avaliados	46
Tabela 4	Descrição da Amostra	49
Tabela 5	Alelos de menor frequência para cada SNP nos grupos avaliados	50
Tabela 6	Análise da associação alélica dos polimorfismos dos genes <i>CR1</i> e <i>CLU</i> em DA (n = 211) x Controle (n=108)	51
Tabela 7	Análise da associação genotípica dos polimorfismos dos genes <i>CR1</i> e <i>CLU</i> em DA x Controle	52
Tabela 8	Análise da associação alélica dos polimorfismos dos genes <i>CR1</i> e <i>CLU</i> em Depressão (n = 182) x Controle (n = 108)	53
Tabela 9	Análise da associação genotípica dos polimorfismos dos genes <i>CR1</i> e <i>CLU</i> em Depressão x Controle	53
Tabela 10	Haplótipos do gene <i>CLU</i>	55

ANEXOS

Página

Anexo 1	Critérios diagnósticos para demência (DSM IV) Critérios diagnósticos da NINCDS-ADRDA para o diagnóstico de Doença de Alzheimer	73
Anexo 2	Bateria de Avaliação dos Pacientes	76
Anexo 3	Parecer do Conselho de Ética em Pesquisa	77
Anexo 4	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	78
Anexo 5	Protocolo de extração de DNA dos leucócitos pelo método da solução salina concentrada	80

ABREVIATURAS

A β – proteína beta amiloide
APOE – apolipoproteína E
APP – Proteína precursora amiloide (*amyloid precursor protein*)
AVD – Atividades de Vida Diária
AVE - acidente vascular encefálico
BDNF - fator neurotrófico derivado do cérebro (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*)
BPSD – Sintomas Comportamentais e Psicológicos da Demência (*Behavioural and Psychological Symptoms in Dementia*)
CDR – Escala Clínica de Demência (*Clinical Dementia Rating*)
CERAD – Consórcio para estabelecimento de Registro para a Doença de Alzheimer (*Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease*)
CID - Classificação Internacional de Doenças
CLU: Clusterin
COEP - Conselho de ética em Pesquisa
Cr - cromossomo
CR1: Complement Receptor 1
DA – Doença de Alzheimer
DAC - doença arterial coronariana
DP - desvio padrão
DM – Diabetes Melitus
DNA - ácido desoxirribonucléico
DSM-IV - *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*
EOAD: Early-Onset Alzheimer Disease
EUA - Estados Unidos da América
g - gramas
GDS - geriatric depression scale (escala de depressão geriátrica)
GWAS – Genome Wide Association Study
EDTA - ácido tetra etileno diamínico
HF - história familiar
IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
K⁺ - íon potássio
KCl - cloreto de potássio
LOAD: Late-Onset Alzheimer Disease
LD – desequilíbrio de ligação (*linkage disequilibrium*)
MgCl₂ – cloreto de magnésio
mg - miligramas
ml - mililitros
mM - milimolar
mRNA - ácido ribonucléico (RNA) mensageiro
 μ l - microlitro
Na⁺ - íon sódio
Ng - nanogramas
NINCDS-ADRDA: *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke – Alzheimer's Disease and Related Disorders Association*
OMS - Organização Mundial de Saúde
OR - *odds ratio*
PA - Pressão Arterial
PICALM: *Phosphatidylinositol Binding Clathrin Assembly Protein*
pb - pares de bases
PCR - reação da polimerase em cadeia (*polymerase chain reaction*)

RR - risco relativo
SES - Secretaria Estadual de Saúde
SNC - sistema nervoso central
SNP - *single nucleotide polymorphism* (polimorfismo de nucleotídeo único)
SUS – Sistema único de Saúde
TDM - Transtorno Depressivo Maior
UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

Agradecimentos.....	II
Resumo.....	IV
Resumo em inglês.....	V
Lista de figuras.....	VI
Lista de tabelas.....	VII
Anexos	VIII
Abreviaturas.....	IX
Sumário.....	XI
1. Introdução.....	13
1.1 Envelhecimento brasileiro e as consequências na saúde.....	13
1.2 Epidemiologia da demência e da depressão no idoso.....	14
1.3 Demência e depressão no idoso: apresentação clínica e critérios Diagnósticos.....	15
1.4 Etiopatogenia da demência de Alzheimer e da depressão.....	24
1.5 Aspectos Genéticos da Demência de Alzheimer e da depressão.....	27
1.6 Apolipoproteína E (APOE).....	32
1.7 <i>Clustering</i> (CLU).....	32
1.8 Sinergismo entre <i>CLU</i> e <i>APOE</i>	35
1.9 <i>Complement Receptor 1</i> (CR1).....	35
2. Objetivos.....	37
2. 1 Objetivo gerais.....	37
2. 2 Objetivos específicos.....	37
3. Materiais e métodos.....	38
3.1 Desenho do estudo.....	38
3.2 Seleção da amostra.....	39
3.3 Variáveis analisadas.....	43
3.3.1 Dados sócio-demográficos.....	43
3.3.2 Dados sobre a Demência de Alzheimer.....	43
3.3.3 Dados sobre a depressão maior.....	43

3.3.4 Dados sobre os participantes pertencentes ao grupo controle.....	43
3.3.5 Variáveis genéticas.....	43
3.4 Considerações éticas.....	44
3.5 Genotipagem.....	45
3.5.1 Extração de DNA a partir de leucócitos pelo método de solução salina concentrada.....	45
3.5.2 Polimorfismos estudados.....	45
3.5.3 PCR em tempo real (<i>Real time PCR</i>)	45
3.5.4 Ensaio de <i>TaqMan</i>	47
3.6 Análise Estatística.....	48
4. Resultados.....	49
4.1 Caracterização da amostra.....	49
4.2 Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE).....	50
4.3 Resultados da Genotipagem.....	50
5. Discussão.....	56
6. Conclusões.....	61
7. Referências bibliográficas.....	62
8. Anexos	73

1. INTRODUÇÃO

1.1 Envelhecimento brasileiro e suas consequências na saúde

O Brasil apresenta uma taxa de envelhecimento populacional exuberante. Segundo o IBGE, em 2010, a população brasileira era de 190.755.799 habitantes, dos quais 20.590.599 eram considerados idosos (idade \geq 60 anos), correspondendo a 10,8% da população brasileira. Percebe-se claramente uma rápida mudança na representatividade dos grupos etários: o grupo de crianças de zero a quatro anos do sexo masculino, por exemplo, representava 5,7% da população total em 1991, enquanto o feminino representava 5,5%. Em 2000, estes percentuais caíram para 4,9% e 4,7%, chegando a 3,7% e 3,6% em 2010. Simultaneamente, o alargamento do topo da pirâmide etária pode ser observado pelo crescimento da participação relativa da população com 65 anos ou mais, que era de 4,8% em 1991, passando a 5,9% em 2000 e chegando a 7,4% em 2010 (14.081.480 habitantes). Em 1991, o grupo de 0 a 15 anos representava 34,7% da população. Em 2010 esse número caiu para 24,1%. Já a população com mais de 65 anos correspondia, em 1991, a 4,8% da população e passou para 7,4%, em 2010 (IBGE).

Os principais determinantes desta acelerada transição demográfica no Brasil são a redução expressiva na taxa de fecundidade, associada à forte redução da taxa de mortalidade infantil e o aumento da expectativa de vida. Estima-se que, em 2025, o Brasil ocupará o sexto lugar quanto ao contingente de idosos, alcançando cerca de 32 milhões de pessoas com 60 anos ou mais de idade. Em 2050, as crianças de 0 a 14 anos representarão 13,15%, ao passo que a população idosa ultrapassará os 22,71% da população total.

Desta forma, o Brasil caminha rapidamente para um perfil demográfico mais envelhecido, caracterizado por uma transição epidemiológica, onde as doenças crônico-degenerativas ocupam lugar de destaque. O incremento das doenças crônicas implicará na necessidade de adequações das políticas sociais, particularmente daquelas voltadas para atender às crescentes demandas nas áreas da saúde, previdência e assistência social (Mendes EV, 2009).

Na área da saúde, esta rápida transição demográfica e epidemiológica traz grandes desafios, pois é responsável pelo surgimento de novas demandas de saúde, especialmente a “epidemia de doenças crônicas e de incapacidades funcionais”, resultando em maior e mais prolongado uso de serviços de saúde.

Dentre as doenças crônico-degenerativas, destacam-se a demência de Alzheimer e a depressão, associadas a declínio funcional significativo e dependência nas atividades do cotidiano (Schmidt et al, 2011).

1.2 Epidemiologia da demência e da depressão no idoso

A prevalência de demência aumenta de forma importante com a idade, dobrando a cada cinco anos, variando de 1,5% entre 60 e 64 anos a quase 40% nos nonagenários. A prevalência global desta patologia é estimada em 3,9% nos sujeitos com idade igual ou superior a 60 anos, com uma variação importante entre os continentes, de 1,6% na África a 6,4% na América do Norte. Na América Latina a taxa de prevalência é de 7,1% e no Brasil varia entre os estudos de 6,0% a 7,1%. A incidência mundial anual é estimada em 7,5 casos a cada 1000 habitantes idosos (Nitrini et al, 2009).

Em 2001, estimou-se a população com demência em 24 milhões de pessoas. A expectativa atual é que este número dobre a cada 20 anos, alcançando 81 milhões de pessoas em 2040. Embora os países desenvolvidos apresentem maior taxa de prevalência, a maior parte destes indivíduos está em países subdesenvolvidos. Em 2001, 61% destes estavam em países em desenvolvimento e espera-se que em 2040 sejam 71%.

A doença de Alzheimer é a principal causa de demência irreversível, responsável por 60 a 80% dos casos (Nowrangi M.A. et al, 2011). A idade avançada é o fator de risco mais importante, de tal forma que a frequência da doença cresce exponencialmente com a idade, duplicando a cada 5 anos, pelo menos até 85-90 anos, variando de 5% após 65 anos até 40-50% após os 85 anos. Nos EUA, estima-se que a doença de Alzheimer esteja presente em 4,5 milhões de idosos, distribuídos da seguinte forma: 7% entre 65 a 74 anos, 53% entre 75 a 84 anos e 40% entre os idosos com 85 anos ou mais. A doença é considerada leve, moderada ou grave em, respectivamente, 48%, 31% e 21% dos casos. A incidência da doença varia de 1% aos 60 anos até 30% aos 85 anos (Qiu, 2007). Estes números são desconhecidos no Brasil (Lopes et al, 2005). Provavelmente, o número de portadores de demência no Brasil esteja entre 500 mil a 1 milhão de pessoas (Bottino e cols, 2008). Em Catanduva, a prevalência de demência aumentou com a idade, variando de 1,6% na faixa etária de 65 a 69 anos, até 38,9% entre os idosos com 85 anos ou mais. A doença de Alzheimer foi responsável por 55,1% dos casos de demência, seguida pela demência mista (14,4%) e demência vascular (9,3%) (Herrera et al, 2002).

A frequência de depressão é de aproximadamente 5% na população geral. Entretanto, a prevalência ao longo da vida chega a 20%. O risco para transtorno depressivo maior durante a vida tem variado de 10 a 25% para as mulheres e de 5 a 12% para os homens. Estudo epidemiológico populacional envolvendo 10 países mostrou uma

taxa de depressão ao longo da vida variando de 1.5 a 19 casos a cada 100 adultos e uma taxa anual de 0.8 a 5.8 casos para cada 100 adultos (Weissman et al, 1996).

No Brasil, a prevalência de depressão entre idosos varia de 4,7 a 36,8%, dependendo fundamentalmente dos instrumentos diagnósticos utilizados e de seus pontos de corte, além da gravidade dos sintomas. A prevalência e a incidência da depressão dobram após 70 a 85 anos. É um dos transtornos psiquiátricos mais comuns nos idosos (Ministério da Saúde, 2006) e caracteriza-se por uma tríade de sintomas: humor deprimido, anedonia e fadiga (Alexopoulos, 2005).

1.3 Demência e depressão no idoso: apresentação clínica e critérios diagnósticos

O quadro clínico da doença de Alzheimer é extremamente variável. O início é, usualmente, insidioso e a progressão lenta. Os familiares não percebem ou não valorizam o déficit cognitivo e, caso percebam, atribuem ao envelhecimento *per se* (“esquecimento da idade”). Na fase pré-clínica, o esquecimento pode ser classificado como transtorno cognitivo leve amnésico (Louise, 2006). Há agravamento progressivo do déficit cognitivo e comprometimento das atividades de vida diária instrumentais, mais complexas, como dificuldades no controle do dinheiro e da medicação, fazer compras, etc, caracterizando a incapacidade cognitiva (Yaar, 2007).

A triagem cognitiva é marcada pelo prejuízo nos testes que avaliam predominantemente a memória de longo prazo explícita episódica, função executiva e linguagem (Nitrini et al, 2005). Percebe-se, claramente, um gradiente temporal na perda da memória episódica. Inicialmente, o paciente tem maior dificuldade nos relatos autobiográficos mais recentes e discreta desorientação temporal. Nesta fase, há pouca desorientação espacial. Na linguagem, percebe-se dificuldade de encontrar as palavras certas, anomia (dificuldade de nomear) e empobrecimento do discurso. O paciente torna-se mais repetitivo, contando os mesmos casos ou fazendo as mesmas perguntas. Caracteristicamente, o paciente não percebe a gravidade da perda cognitiva e funcional (anosognosia). São comuns os acidentes domésticos e de trânsito, além da perda de objetos, dinheiro, má gestão financeira e dificuldade na administração da casa e da família (contas, pagamentos, compromissos, etc). Impaciência, desconfiança excessiva, irritabilidade podem estar presentes. Memória, função executiva, linguagem e a função visuoespacial apresentam deterioração progressiva e os distúrbios comportamentais passam a se destacar (Patterson et al, 2008). Delírios de roubo, infidelidade, perseguição são relativamente comuns e associados com inversão do ciclo sono-vigília, insônia e agitação noturna. Não é raro o “fenômeno do entardecer”, caracterizado pela piora

cognitiva e comportamental no final do dia. Alucinações visuais ou auditivas podem estar presentes, mas não são usuais na fase inicial da doença, como na doença por corpos de Lewy. O início da sintomatologia comportamental é, normalmente, o sinal de alerta mais valorizado pela família e responsável pelo diagnóstico da doença. Não é raro o uso indiscriminado de drogas psicotrópicas, com potente ação anticolinérgica ou antidopaminérgica, usadas para sedar o paciente. O maior perigo é a iatrogenia medicamentosa, comum nesta fase. Os acidentes mais comuns relacionam-se aos efeitos colaterais das drogas utilizadas, que podem resultar em hipotensão ortostática, quedas, fratura de fêmur, parkinsonismo, constipação intestinal, fecaloma, retenção urinária e descompensação das co-morbidades presentes. Confusão mental aguda (*delirium*) e/ou depressão podem se associar e atrasar o diagnóstico específico. O grau de desorientação têmporo-espacial é significativo, o discurso bem empobrecido, com relativa preservação apenas da memória episódica mais remota e maior comprometimento da memória semântica. A disfunção visuoespacial impede o paciente de locomover-se sozinho, mesmo em ambientes conhecidos. A dependência nas atividades de vida diária instrumentais progride para as AVD's básicas e torna-se indispensável a presença do cuidador, durante a maior parte do tempo. A mobilidade está, usualmente, comprometida e o risco de quedas e fratura de fêmur é bastante elevado, principalmente nas mulheres. Apraxia e agnosia tornam-se proeminentes e o grau de dependência caminha para ser completo (Moraes, 2010).

A sobrevida média pode variar de 2 a 20 anos. Usualmente, a duração da doença, após o diagnóstico, é de 4 a 6 anos. Representa o principal preditor de mortalidade em idosos maiores de 65 anos, superando a doença cardiovascular, AVC, diabetes e câncer. As formas mais precoces da doença (< 65 anos), sexo masculino, distúrbios da marcha, ICC, *diabetes mellitus*, gravidade da doença e presença de sintomatologia psicótica, extrapiramidal e sinais de liberação frontal são preditores de evolução mais rápida da doença (Chertkow, 2008).

Não há nenhum exame complementar suficiente para o diagnóstico de certeza (Waldemar, 2007). O diagnóstico conclusivo da doença de Alzheimer é, eminentemente, clínico e baseia-se na exclusão das outras causas de incapacidade cognitiva e de demência (Feldman, 2008). Os critérios diagnósticos mais utilizados são propostos pelo DSM-IV e NINCDS-ADRDA (*National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke – Alzheimer's Disease and Related Disorders Association*). Os critérios propostos pelo *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke* e *Alzheimer's Disease and Related Disorders Association* (NINCDS-ADRDA)

para a doença de Alzheimer (McKhann, 1984) são categorizados da seguinte forma: doença de Alzheimer Provável, achados que tornam o diagnóstico de doença de Alzheimer improvável ou incerto, doença de Alzheimer possível, doença de Alzheimer definitiva e classificação da doença de Alzheimer (Anexo 1).

Mais recentemente, em 2011, estes critérios foram revistos (McKhann, 2011). O diagnóstico de demência deve ser feito na presença de sintomas cognitivos ou comportamentais (neuropsiquiátricos) associados com:

1. Comprometimento das atividades de vida diária;
2. Declínio em relação a um funcionamento prévio;
3. A sintomatologia não pode ser explicada pela presença de *delirium* ou desordem neuropsiquiátrica prévia (transtornos mentais/ “doença mental”);
4. Declínio cognitivo percebido pela combinação de:
 - 4.1 História relatada pelo pacientes e/ou informante ;
 - 4.2 Avaliação cognitiva objetiva: exame do estado mental pela triagem cognitiva (“*bedside*”) ou avaliação neuropsicológica formal. Este último deverá ser reservado quando a a história do paciente e a triagem cognitiva não forem suficientes para a definição diagnóstica.
5. A sintomatologia cognitiva ou comportamental envolve, no mínimo, dois domínios abaixo relacionados]:
 - 5.1 Amnésia
 - 5.2 Disfunção executiva
 - 5.3 Disfunção visuoespacial
 - 5.4 Afasia
 - 5.5 Mudanças na personalidade, comportamento ou condutas sociais

Com esta nova classificação da doença de Alzheimer, houve maior valorização da sintomatologia comportamental e das formas não amnésticas da doença de Alzheimer. Além disso, a probabilidade diagnóstica de DA é reforçada pela presença dos biomarcadores proteína β -amilóide e/ou proteína *Tau* (com evidências fisiopatológicas de DA), da mesma forma que a presença de declínio progressivo documentado e/ou presença de mutação genética específica para DA (McKhan et al, 2011).

A depressão refere-se a uma síndrome psiquiátrica caracterizada por humor deprimido, perda do interesse ou prazer, alterações do funcionamento biológico, com repercussões importantes na vida do indivíduo e com uma duração de meses a anos. Não é uma consequência natural do envelhecimento. É uma doença com sintomatologia

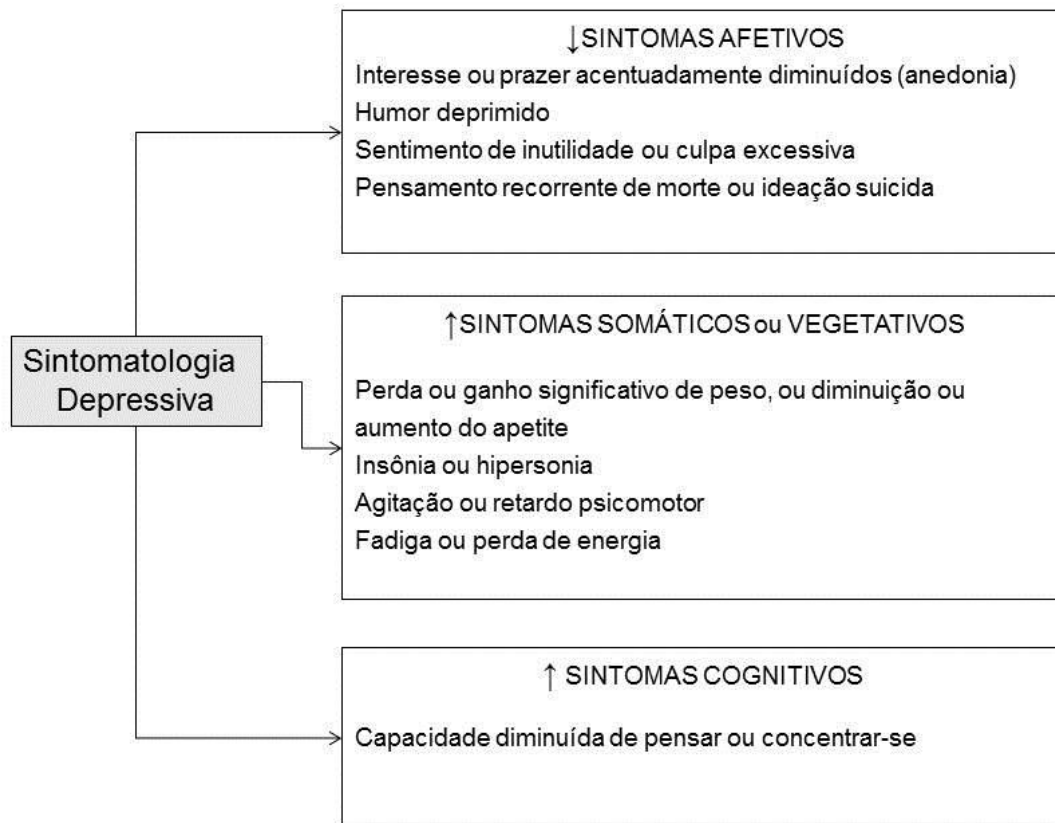
psíquica e somática, que está incluída dentro dos distúrbios do humor, segundo o DSM-IV. Está entre as três principais causas de incapacidade no mundo moderno e constitui-se em verdadeira "epidemia silenciosa", cuja importância na morbi-mortalidade geral se aproxima à observada nas doenças crônico-degenerativas. Em 2030, estima-se que o transtorno depressivo unipolar venha a assumir a segunda posição como causa de incapacidade em todo o mundo e a primeira causa nas nações de renda per capita elevada (Gonzalez, 2010).

Baseado nos critérios do DSM IV, a depressão geriátrica se subdivide em depressão de início precoce ou de início tardio, considerando a época do primeiro episódio antes ou após os 65 anos. Cerca de 50% ou mais das desordens depressivas são classificadas com depressão de início tardio (Fiske et al, 2009).

Os transtornos do humor podem ser a primeira manifestação de doenças como a doença cerebrovascular, *diabetes mellitus*, câncer, hipotireoidismo e doença arterial coronariana (Moussavi et al, 2007). As principais consequências da depressão no idoso são: redução do autocuidado, não aderência ao tratamento, suicídio, dependência a drogas (álcool e outras drogas ilícitas), polifarmácia, prolongamento do tempo e do custo das internações, má resposta à reabilitação, inapetência com perda significativa de peso e desenvolvimento da síndrome da fragilidade. A depressão pós-AVC ou pós-IAM aumenta a mortalidade em 3 a 4 vezes em 10 anos.

Os critérios diagnósticos para as desordens do humor são semelhantes aos adotados no adulto. Todavia, há predomínio da sintomatologia somática ou vegetativa, com amplificação das queixas físicas (idoso poliqueixoso ou hipocondríaco). Há redução da intensidade dos sintomas afetivos, com negação dos sentimentos de tristeza (depressão sem tristeza), desesperança e de ideação suicida, dificultando mais ainda o diagnóstico (Figura 01). Em geral, os sintomas ansiosos são mais freqüentes. Em outros casos, os sintomas cognitivos são suficientemente graves para causar incapacidade cognitiva ("pseudodemência").

Figura 01
Sintomatologia depressiva mais frequente no idoso

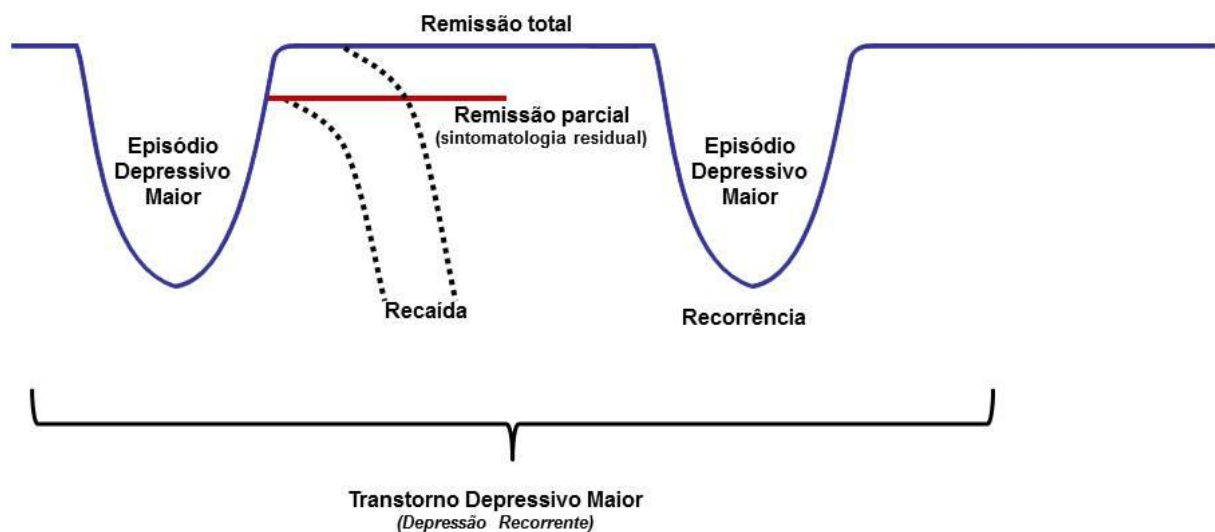


A depressão no idoso pode ser classificada em (Moraes EN, Lanna FM, 2010):

- Depressão Maior:** a prevalência varia de 1 a 4%. Há maior tendência à cronificação e recorrência, com recuperação mais lenta e recaídas frequentes (Figura 02).

Figura 02

História natural do transtorno depressivo maior (Adaptado de Kupfer D.J., 1991)



- b. **Distímia:** a prevalência é de 2% dos idosos. Dificilmente tem início na velhice. É um distúrbio do humor crônico (> 2 anos). Usualmente os sintomas são mais leves que na depressão maior e o curso é relativamente persistente. Os pacientes são pessimistas crônicos e tem baixa estima, mau humor persistente. A principal diferença é, portanto, a gravidade da sintomatologia e a duração. A ocorrência de um episódio de depressão maior superposto à distímia é bastante freqüente (depressão dupla), além de sintomas de ansiedade. Idosos com distímia de início tardio tem maior prevalência de doença cardiovascular, maior risco de desenvolver depressão dupla e maior resistência ao tratamento (Lawhorne L., 2005).
- c. **Depressão subsindrômica:** a prevalência é de 8 a 13%. O diagnóstico é feito quando a sintomatologia não é grave o suficiente para preencher os critérios do DSM-IV para depressão maior (< 5 critérios) ou para distímia (duração menor que 2

anos). É necessária a presença de um sintoma principal (humor deprimido ou anedonia) e mais 1 a 3 sintomas adicionais. O impacto da depressão subsindrômica ou depressão menor no idoso é semelhante ao observado na depressão maior, incluindo declínio funcional, auto-percepção negativa da saúde, maior utilização de serviços de saúde e elevado custo de tratamento. Além disso, estes pacientes têm maior risco de desenvolver depressão maior e ideação suicida (Thakur M., Blazer D.G., 2008);

- d. **Depressão psicótica:** ocorre mais comumente no idoso e é considerada uma forma mais grave de depressão. Habitualmente, o paciente refere história pessoal ou familiar de depressão. O risco de recaída e de sintomatologia residual (remissão parcial) são mais freqüentes. Caracteriza-se pela presença de sintomatologia depressiva mais grave, associada a alterações do pensamento e da senso-percepção coerentes com os temas depressivos. O paciente refere idéias delirantes congruentes com o humor (delírio de culpa excessiva, caráter persecutório, auto-punição, hipocondria ou sensação de aniquilamento completo). As alucinações são tipicamente auditivas, transitórias e pouco elaboradas, podendo envolver vozes que humilham a pessoa por deficiências ou pecados. O início é, geralmente, subagudo e associado a alterações da memória e disfunção executiva, podendo simular quadros demenciais (“pseudodemência”). Estes pacientes apresentam maior risco de evolução para a demência de Alzheimer.
- e. **Depressão vascular:** a presença de doença cerebrovascular é considerada um importante fator de risco para depressão. Pode ocorrer após episódio de AVC (depressão pós-AVC), descrita mais comumente nos 06 primeiros meses após o AVC, ou associada a alterações isquêmicas encefálicas (“depressão vascular”). Lesões isquêmicas no hemisfério esquerdo, especialmente no córtex pré-frontal esquerdo, estão mais relacionadas com depressão. Nestes pacientes há maior comprometimento cognitivo caracterizado por disfunção executiva, anedonia e apatia, mais do que tristeza, associados à lentificação psicomotora, perda do *insight* (ausência da auto-percepção do problema), menos agitação e menos sentimentos de culpa. O risco de demência vascular é elevado. Por outro lado, a depressão também é considerada um fator de risco para doença cerebrovascular e doença arterial coronariana. Portanto, a íntima relação entre depressão e doença

cardiovascular é recíproca: as doenças cardiovasculares predisõem, precipitam e perpetuam a depressão e esta, por sua vez, agrava as doenças cardiovasculares.

Os critérios diagnósticos de depressão maior, segundo o Manual de Estatística e Diagnóstico de Doenças Mentais (DSM-IV), incluem a presença de 5 ou mais dos seguintes sintomas presentes durante o período de 2 semanas (todos os dias ou quase todos os dias) e que representaram uma alteração do seu funcionamento anterior. Pelo menos um dos sintomas é humor deprimido ou perda do interesse ou prazer. Sintomas nitidamente secundários a condição médica geral ou alucinações não relacionadas ao distúrbio do humor não devem ser incluídos. A seguir relacionamos os sintomas que permitem o diagnóstico:

- **Interesse ou prazer acentuadamente diminuídos:** o idoso deixa de sentir prazer com atividades que anteriormente eram agradáveis, tendendo ao isolamento social e familiar;
- **Humor deprimido indicado por relato subjetivo (sensação de tristeza, auto-desvalorização e sentimentos de culpa) ou observação feita por outros:** o idoso refere sensação de vida vazia, demonstra fácil irritabilidade ou considera-se um peso para a família, afirmando ser a morte a única solução. Tendência à emotividade excessiva, com crises de choro frequentes;
- **Perda ou ganho significativo de peso sem estar em dieta, ou diminuição ou aumento do apetite:** a inapetência é o sintoma mais comum e importante causa de emagrecimento no idoso. Pode predominar no idoso e mascarar sintomas como baixa do humor e anedonia, dificultando o diagnóstico de depressão (depressão mascarada);
- **Insônia ou hipersonia:** habitualmente a insônia é terminal (matinal, despertar cedo e piora matinal da sintomatologia depressiva) ou sono entrecortado e dificuldade para dormir novamente. Portanto, a queixa de insônia, tão comum no consultório, deve sugerir, prontamente, o diagnóstico de depressão;
- **Agitação ou retardo psicomotor;**
- **Fadiga ou perda de energia:** por vezes simulando doenças consumptivas, ICC, hipotireoidismo, parkinsonismo (bradicinesia), polimialgia reumática, etc;
- **Sentimento de inutilidade ou culpa excessiva ou inadequada;**
- **Capacidade diminuída de pensar ou concentrar-se:** lentificação do pensamento com déficit atencional importante, por vezes simulando síndrome demencial (“pseudo-demência”);

- **Pensamentos recorrentes de morte, ideação suicida recorrente.**

Além disso, outros achados devem estar presentes:

- Os sintomas não satisfazem os critérios para um episódio misto;
- Os sintomas não se devem aos efeitos fisiológicos diretos de determinadas substâncias (por exemplo, abuso de drogas ou medicamentos) ou de uma condição médica geral (por exemplo, hipotireoidismo);
- Os sintomas não se devem ao luto, ou seja, após o óbito de um ente querido eles persistem por mais de dois meses ou se caracterizam por acentuado prejuízo funcional, preocupação mórbida com desvalia, ideação suicida ou retardo psicomotor;

Várias escalas quantitativas estão disponíveis para subsidiar o diagnóstico. A Escala Geriátrica de Depressão, versão 15 itens (Sheikh & Yesavage, 1986) é a mais utilizada nos serviços especializados no atendimento a idosos. Esta escala foi validada para a língua portuguesa (Almeida & Almeida, 1998) e é utilizada para o diagnóstico e monitoramento da gravidade dos sintomas durante a evolução da depressão maior em idosos. A versão em português dessa escala encontra-se descrita na tabela 1. O ponto de corte 4/5 (não caso/caso) apresenta sensibilidade de 86.5% e especificidade de 71.1%, devendo ser considerado na pontuação final para o diagnóstico deste transtorno em idosos (Almeida & Almeida, 1998; Paradelo, 2005).

Tabela 1
Escala de Depressão Geriátrica – 15 pontos (GDS-15)

Perguntas	Sim	Não
1- Você está basicamente satisfeito com sua vida?	0	1
2- Você se aborrece com freqüência?	1	0
3- Você se sente um inútil nas atuais circunstâncias?	1	0
4- Você prefere ficar em casa a sair e fazer coisas novas?	1	0
5- Você sente que sua situação não tem saída?	1	0
6- Você tem medo que algum mal vá lhe acontecer?	1	0
7- Você acha que sua situação é sem esperança?	1	0
8- Você acha maravilhoso estar vivo?	0	1
9- Você sente que sua vida está vazia?	1	0
10- Você sente que a maioria das pessoas está melhor que você?	1	0
11- Você se sente com mais problemas de memória do que a maioria?	1	0
12- Você perdeu muitos de seus interesses e atividades?	1	0
13- Você se sente de bom humor a maior parte do tempo?	0	1
14- Você se sente cheio de energia?	0	1
15- Você se sente feliz a maior parte do tempo?	0	1
Pontuação		

Baseado nos critérios do DSM IV, a depressão geriátrica se subdivide em depressão de início precoce ou de início tardio, considerando a época do primeiro episódio antes ou após os 65 anos.

Idosos não dementes portadores de depressão freqüentemente apresentam dificuldades na concentração, velocidade do processamento mental e nas funções executivas. A depressão em idosos pode ser um sintoma de demência incipiente (Skoog, 2004). Os sinais e sintomas de depressão freqüentemente precedem o declínio cognitivo e a demência. Muitos idosos manifestam quadro de incapacidade cognitiva reversível durante um episódio de depressão (“pseudo-demência”), principalmente na depressão de início tardio. Entretanto, uma grande proporção de indivíduos com demência reversível mantém algum grau de incapacidade cognitiva após remissão do episódio depressivo e cerca de 40% desenvolve demência irreversível dentro de três anos de seguimento. A prevalência pontual de depressão em pacientes portadores de doença de Alzheimer é de 17% e é ainda mais freqüente nas demências subcorticais. Desta forma, a demência reversível pode representar uma manifestação precoce freqüente de um transtorno irreversível (Alexopoulos, 2005).

A depressão de início precoce também é um possível fator de risco para demência. Tanto a depressão crônica recorrente quanto depressão cujo primeiro episódio ocorreu mais de 10 anos antes do quadro de demência associam-se a um aumento de risco para o desenvolvimento de Doença de Alzheimer (DA) (Alexopoulos, 2005).

1.4 Etiopatogenia da demência de Alzheimer e da depressão

A demência é definida como uma síndrome clínica caracterizada pela deterioração progressiva de múltiplos domínios da cognição, que são graves o suficiente para interferir na funcionalidade – atividades de vida diária. Representa causa importante de incapacidade, institucionalização e redução de sobrevida na população idosa (Moraes E.N., Lanna F.M., 2010). A principal causa de demência é a doença de Alzheimer, cuja etiopatogenia ainda é pouco conhecida. Fatores genéticos, ambientais e da senescência devem estar associados ao desenvolvimento da doença. Os fatores de risco mais citados na literatura são a idade avançada, a história familiar positiva, o sexo feminino, a síndrome de Down e as formas genéticas da doença (Carrilloa, 2009)

A demência de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa progressiva caracterizada pela perda maciça de neurônios, resultando em comprometimento significativo da neurotransmissão. O substrato neuropatológico da doença de Alzheimer é a presença de placas amilóides extracelulares e emaranhados neurofibrilares, bem como as perdas sinápticas, degeneração neuronal (apoptose), infiltrado inflamatório e angiopatia amiloide (Querfurth e La Ferla, 2010). As placas senis são depósitos extracelulares de agregados insolúveis da proteína β -amilóide, localizadas, inicialmente, no sistema límbico (hipocampo, córtex entorrinal, amígdala e em algumas áreas corticais e subcorticais). A proteína β -amilóide origina-se da clivagem da proteína precursora da β -amilóide (*APP*), glicoproteína presente na membrana celular do neurônio. A clivagem da *APP* pode ocorrer por duas vias enzimáticas: não amiloidogênica, onde a primeira clivagem é feita pela alfa-secretase (α -secretase) e outra amiloidogênica, em que a beta-secretase (β -secretase) é a enzima que primeiro cliva a *APP*. A proteólise via α -secretase não produz a proteína β -amilóide, diferentemente da via β -secretase, onde a clivagem da *APP* origina o peptídeo β -amilóide_{40/42}, após a atuação da *gamma-secretase* (γ -secretase). O peptídeo $A\beta_{42}$ é mais insolúvel e tende à agregação, formando placas neuríticas extracelulares, denominadas placas senis ou amilóides. Os emaranhados neurofibrilares são agregados intracitoplasmáticos de filamentos helicoidais pareados, compostos pela proteína tau hiperfosforilada. A proteína tau é responsável pela estabilidade e funcionamento adequado do sistema microtubular intraneuronal. Na doença de Alzheimer, a proteína tau acumula excesso de fosfato, tornando-se disfuncional, comprometendo o sistema de transporte intracelular (Querfurth HW, LaFerla FM, 2010).

A hipótese etiopatogênica mais aceita baseia-se na teoria amiloide. Esta teoria propõe que a doença de Alzheimer é deflagrada por excesso de produção, deposição e agregação da proteína β -amilóide, levando à disfunção neuronal, oxidação, excitotoxicidade e neuroinflamação, responsável pela apoptose (Ballard C, 2011). O resultado final é o déficit na neurotransmissão colinérgica, serotoninérgica, dopaminérgica e nora-drenérgica, com predomínio da disfunção colinérgica. Além da hipótese da cascata amiloide, não se pode subestimar a importância da hiperfosforilação da proteína tau. A proteína tau tem função estabilizadora dos microtúbulos intraneuronais e do transporte vesicular. Esta proteína hiperfosforilada perde sua função e sofre um processo de agregação em filamentos helicoidais pareados, que são citotóxicos e associados à morte neuronal. Na doença de Alzheimer, são diretamente proporcionais à gravidade da demência. A relação entre as placas amilóides e os emaranhados neurofibrilares é

incerta, mas sabe-se que o acúmulo da proteína β -amilóide predispõe à hiperfosforilação da proteína tau (Quenfurth HW, LaFerla FM, 2010).

A neurotoxicidade causada pelo acúmulo das placas senis e dos emaranhados neurofibrilares deflagram uma reação inflamatória, com ativação da via do complemento. A proteína β -amilóide e a proteína tau hiperfosforilada são capazes de ativar diretamente a via clássica do complemento. Desta forma, a neuroinflamação também está associada à etiopatogenia da doença (Crehan, 2011).

A depressão de início tardio pode estar associada a lesão da circuitaria fronto-subcortical, especialmente as vias estriato-pálido-tálamo-corticais, devido a doenças neurodegenerativas e/ou cerebrovasculares (Alexopoulos 2005).

A depressão no idoso apresenta caráter multifatorial e resulta da interação de fatores biológicos e psicossociais. Perda do cônjuge, luto, presença de incapacidades, dependência física, isolamento social, aposentadoria, baixo nível sócio-econômico, perdas financeiras, sobrecarga do cuidador, representam os mais frequentes fatores psicossociais associados à depressão (Fiske, 2009).

Pode ser secundária a condições médicas como hipo ou hipertireoidismo, hipo ou hiperparatireoidismo, neoplasias, doença cerebrovascular e desordens metabólicas como a deficiência de vitamina B12 ou desnutrição. Algumas drogas estão associadas a sintomas depressivos, como a metildopa, propranolol, benzodiazepínicos, reserpina, esteroides, antiparkinsonianos, β -bloqueadores, cimetidina, dentre outras.

Os mecanismos neuro-endócrinos envolvidos na etiopatogenia da depressão podem ser agrupados em três teorias. A hipótese monoaminérgica da depressão maior baseia-se na presença de comprometimento da neurotransmissão de serotonina, noradrenalina e dopamina (Urani e cols., 2005), responsável pela sintomatologia da doença. Por sua vez, a hipótese das neurotrofinas defende a idéia de que a depressão resulte da depleção do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (*BDNF*) (*Brain-derived neurotrophic factor*), responsável pela plasticidade e trofismo das células neuronais. E, finalmente, a hiperestimulação do sistema hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) levaria a um estado de hipercortisolismo persistente, com conseqüente comprometimento da neurogênese do sistema hipocampal e dos circuitos fronto-estriatais (Blazer & Hybels, 2005).

1.5 Aspectos genéticos da demência de Alzheimer e da depressão

Indivíduos com doença de Alzheimer são tipicamente divididos em dois grupos, baseados na idade de início da doença. Na doença de Alzheimer de início precoce, as manifestações clínicas tem seu início antes dos 65 anos de idade (*Early-Onset AD - EOAD*). A doença apresenta forte caráter familiar e algumas formas são causadas por mutações autossômicas dominantes raras nos genes que codificam a Proteína Precursora da β -amilóide (APP, localizado no cromossomo 21), *Pré-Senilina 1 (PSEN1)*, localizado no cromossomo 14) e a *Pré-Senilina 2 (PSEN2)*, localizado no cromossomo 1). Estas formas monogênicas da doença são responsáveis por 1 a 2% de todos os casos (Wingo T, 2012). Tais mutações resultam em maior produção e agregação da proteína β -amilóide, dando origem às placas senis, marcador histopatológico da doença. Nestes pacientes, a doença é caracterizada pela maior frequência de mioclonia e alterações da linguagem (Rossor M, 2010).

A maioria dos casos de doença de Alzheimer tem início após os 65 anos de idade (*Late-Onset AD - LOAD*). Esta forma tardia da doença é considerada esporádica, pois não apresenta caráter familiar evidente e pode ser explicada por herança genética complexa não mendeliana. Nesta forma há um forte componente genético, de caráter poligênico, estimado em 60 a 80% do risco. Este risco genético é similar ao observado na esquizofrenia (~80%), *diabetes mellitus* (~40%) e doença de Parkinson (~30%) (Lambert JC, Amouyel P, 2011).

A doença de Alzheimer de início tardio (*LOAD*) é complexa e multifatorial, resultante da interação entre fatores genéticos e ambientais, ainda pouco conhecidos. Do ponto de vista genético, o gene codificador da apolipoproteína E (*ApoE*) era o único associado à doença (Hollingworth P, 2011). Este gene, localizado no cromossomo 19, é composto por três alelos comuns ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$). A presença do alelo $\epsilon 4$ do gene da *Apo E* aumenta o risco das formas tardias da DA, de forma dose-dependente. A presença de um alelo $\epsilon 4$ aumenta o risco em 3-4 vezes, enquanto o genótipo $\epsilon 4 / \epsilon 4$ está associado a um risco 15 vezes maior. O risco sofre influência de fatores como idade, sexo e raça e a presença do alelo $\epsilon 4$ não é considerado nem suficiente e nem necessário para o desenvolvimento da doença de Alzheimer. Estima-se que 50% dos pacientes portadores da doença de Alzheimer não apresentam este genótipo. Além disso, cerca de 14% das pessoas apresentam o alelo $\epsilon 4$ e, provavelmente, mais de 50% poderá envelhecer sem a

doença. Atualmente, estima-se que a *ApoE* pode explicar cerca de 20% do risco atribuível de DA (Lambert JC, Amouyel P, 2011).

No período de 1993 a 2009, a *ApoE* foi o único gene associado ao risco de doença de Alzheimer. Recentemente, grandes estudos multicêntricos chamados *Genome Wide Association Studies (GWAS)* identificaram outros novos genes envolvidos na Doença de Alzheimer de início tardio (Quadro 01): *CLU (Clusterin)*, *CR1 (Complement Receptor 1)*, *PICALM (Phosphatidylinositol-Binding Clathrin Assembly Protein)*, *BIN1 (Bridging Integrator 1)*, *ABCA7 (ATP Binding Cassette Transporter)*, *MS4A Cluster (Membrane Spanning 4-Domains Subfamily A)*, *CD2AP (CD2 Associated Protein)*, *CD33 (Sialic Acid-Binding Immunoglobulin-Like Lecitin)* e *EPHA 1 (Ephrin Receptor 1)*. A descoberta desses novos genes trouxe grande impacto na compreensão da LOAD (Morgan K, 2011).

Quadro 01

Genes associados com a doença de Alzheimer de início precoce e tardio

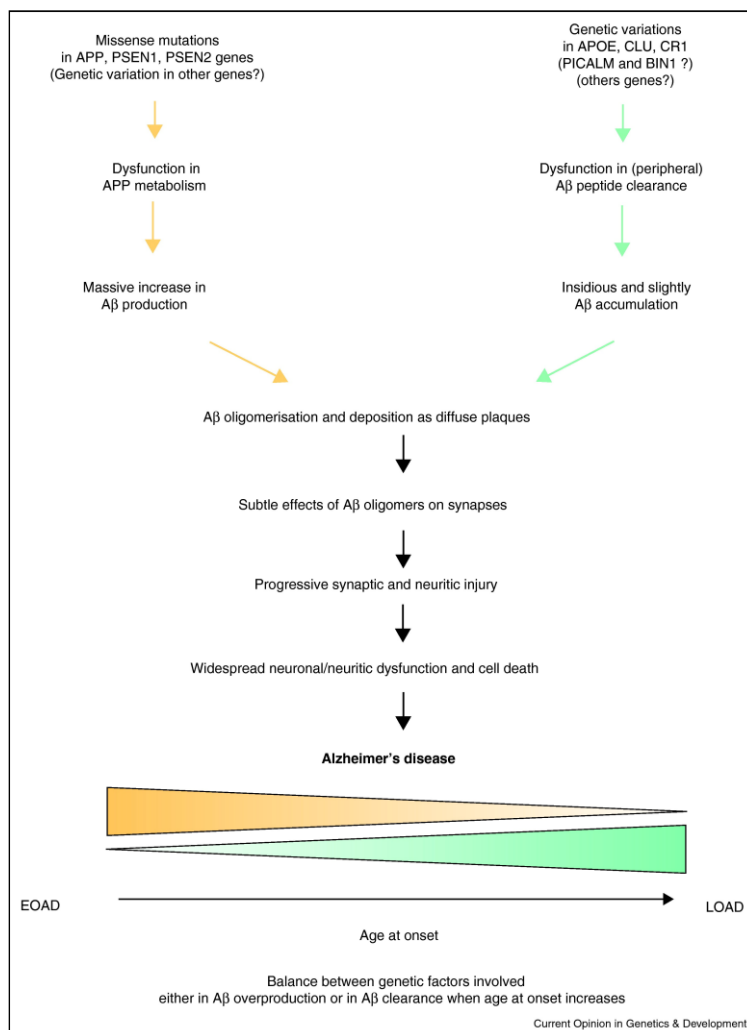
	Idade de início	Padrão de herança	Gene	Cromossomo
Doença de Alzheimer	Forma Precoce (EOAD) ≤ 65 anos	Herança Autossômica Dominante (1 a 2% dos casos)	Gene da proteína <i>Precursora Da β - Amilóide (APP)</i>	21
			Gene precursor da <i>Pré-Senilina 1 (PSEN1)</i>	14
			Gene precursor da <i>Pré-Senilina 2 (PSEN2)</i>	1
	Forma Tardia (LOAD) ≥65anos	Herança Complexa (Não Mendeliana)	Alelo $\epsilon 4$ (APOE) <i>Efeito dose-dependente</i> <i>Genótipos:</i> $\epsilon 4/\epsilon 3$: 3x $\epsilon 4/\epsilon 4$: 15x	19
			<i>CR1</i>	1
			<i>CLU</i>	8
			<i>PICALM</i>	11
			Outros...	>30 genes (www.alzgene.org)

Acredita-se que estes genes, conjuntamente, expliquem cerca de 50% da genética da LOAD e direcionem para outras vias patogênicas ligadas ao funcionamento do sistema imune (*CLU*, *CR1*, *ABCA7*, *MS4A cluster*, *CD 33* e *EPHA1*), ao metabolismo do colesterol (*APOE*, *CLU*, *ABCA7*) e ao processo sináptico da membrana celular (*PICALM*, *BIN1*, *CD33*, *CD2AP* e *EPHA1*) (Morgan K., 2011). Estes genes não auxiliam na predição do risco para Doença de Alzheimer, mas podem ter importante papel na identificação dos mecanismos fisiopatogênicos da doença e de potenciais drogas-alvo (Ballard C., 2011).

A tendência atual é explicar as duas formas da doença através de um mecanismo comum de acúmulo da proteína β amilóide: na EOAD predomina a produção maciça e

rápida de A β , enquanto que na *LOAD* ocorre um acúmulo lento e insidioso de A β , devido a uma disfunção na depuração desta proteína (Lambert JC, Amouyel P, 2011). Desta forma, a idade de início da doença dependerá do balanço entre os fatores genéticos envolvidos na produção (*APP*, *PSEN1* e *PSEN2*) e aqueles envolvidos na depuração da A β , como *APOE*, *CLU*, *CR1*, dentre outros (Figura 03).

Figura 03
Fisiopatologia da doença de Alzheimer



Retirado de Lambert J.C, 2011.

Os transtornos depressivos são resultantes da interação entre os fatores biológicos e psicossociais. Dentre os fatores biológicos, a participação dos fatores genéticos é cada vez mais evidente e responsável por 30 a 40% do risco de desenvolvimento de depressão. Diversos genes candidatos estão envolvidos (Lorrof FW, 2010), como o polimorfismo ligado ao gene do Transportador da Serotonina *5-HTT* (*5-HTTLPR*), o gene

codificador da enzima *Triptofano Hidroxilase (TPH2)*, *Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)*, *Catecol-O-Metiltransferase (COMT)* e *Apoliproteína E (APOE)*.

O gene codificador da enzima *Triptofano Hidroxilase (TPH2)*, responsável pela regulação da produção de serotonina nos neurônios serotoninérgicos originários do Núcleo da Rafe. Polimorfismos no gene *TPH2* foram associados com a redução dos níveis de serotonina no SNC, sugerindo que certos polimorfismos possuem a capacidade de alterar o funcionamento da via serotoninérgica (Zhang et al, 2004). Segundo Pereira P. et al (2011), em estudo recente realizado nesta mesma amostra, houve uma associação genotípica entre dois tagSNPs do gene *TPH2*, *rs4565946* e *rs11179000*, e a depressão de início tardio. Para o tagSNP *rs11179000* foi observado maior risco para o desenvolvimento de depressão de início tardio para indivíduos portando o alelo ancestral. Esses resultados reforçam a hipótese neurobiológica do envolvimento do sistema serotoninérgico na etiopatogênese da depressão de início tardio.

O gene do Transportador da Serotonina (*5-HTT*) é responsável pelo transporte ativo de *5-HT* nos neurônios, células enterocromafins, plaquetas e outras células, também está envolvido na doença. A presença da variante alelo curto do polimorfismo ligado ao gene *5-HTT (5-HTTLPR)* está associada a uma redução de aproximadamente 50% na expressão da proteína transportadora de serotonina, assim como maior vulnerabilidade para desenvolvimento de transtornos do humor (ansiedade e depressão) e resposta inadequada aos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (SSRI) (Goltser-Dubner, 2010).

Da mesma forma, polimorfismos do gene do *BDNF*, envolvidos na produção do fator neurotrófico derivado do cérebro (*Brain-derived neurotrophic factor – BDNF*) estão associados a maior risco da doença. Na depressão de início tardio, Bicalho (2010) observou que o genótipo CT do Tag SNP *rs7124442* foi mais frequente em relação aos controles ($p=0,019$), tanto na amostra global como no sexo masculino.

A relação entre o gene da *COMT (Catecol-O-Metiltransferase)*, responsável pela produção de dopamina no SNC, e o risco de depressão é controverso. Segundo Bicalho 2011, houve uma associação uma interação sinérgica entre *5-HTTLPR* e o polimorfismo da *COMT rs4680*.

Por fim, o gene da *APOE ε2* parece estar associado a efeito protetor significativo para o desenvolvimento de transtornos depressivos (Lotrich, 2011), mas a associação entre a *APOE* e depressão é bastante controversa (Alexopoulos, 2005). Da mesma forma, não há evidência de associação entre a depressão e os genes da *Clusterin (CLU)* e do *CR1*.

1.6 Apolipoproteína E (APOE)

O gene da apolipoproteína E está localizado no cromossomo 19 e apresenta três isoformas $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$. Evidências sugerem que a *APOE* $\epsilon 4$ é menos eficiente do que a *APOE* $\epsilon 3$ no transporte cerebral de colesterol (Bu, 2009). O alelo $\epsilon 4$ é menos eficiente do que o alelo 3 na manutenção e no reparo neuronal e sináptico após um trauma (Lane & Farlow, 2005; Kim, Basak & Holtzman, 2009). Não há evidências sugestivas de participação da *APOE* na produção da $A\beta$. Todavia, a *APOE* é responsável pela agregação, deposição, conformação e toxicidade da $A\beta$. A *APOE* $\epsilon 4$ está associada a maior neurotoxicidade induzida pelo oligômero $A\beta_{42}$ que *APOE* $\epsilon 3$. Os peptídeos $A\beta$ ligam-se à *APOE3* com maior afinidade do que com a *APOE* $\epsilon 4$. Desta forma, a *APOE* $\epsilon 3$ remove a $A\beta$ mais eficientemente do que a *APOE* $\epsilon 4$.

O alelo $\epsilon 4$ está associado a redução da expressão das enzimas proteolíticas neprilina e da enzima degradadora de insulina (IDE), responsáveis pela clivagem e neutralização da $A\beta$. A *APO* $\epsilon 3$ promove a degradação de $A\beta$ pela neprilina e pela IDE de forma mais eficiente do que a *APOE* $\epsilon 4$ (Bu, 2009; Jaeger & Pietrzik, 2008; Lane & Farlow, 2005).

Os alelos $\epsilon 2$ e $\epsilon 3$ podem se ligar à proteína *tau* e prevenir sua hiperfosforilação. Embora o alelo 4 também se ligue à *tau*, ela não previne sua hiperfosforilação, e pode determinar sua desestabilização. (Zuo e cols., 2006).

Strittmatter, em estudos realizados em 1993, especulou que não seria a presença do alelo $\epsilon 4$ e, sim, a ausência dos alelos $\epsilon 2$ e $\epsilon 3$, que determinaria o início das alterações patológicas associadas à DA. Pessoas que possuem o alelo $\epsilon 2$ têm maior probabilidade de se tornarem centenárias que aquelas com o alelo $\epsilon 3$, que, por sua vez, parecem ter maior sobrevida que pessoas com o alelo $\epsilon 4$.

1.7 Clusterin (CLU)

A *Clusterin* ou apolipoproteína J (*APOJ*) é uma proteína associada com as lipoproteínas de alta densidade (HDL) no plasma humano. É encontrada em vários tecidos humanos e tem as concentrações mais elevadas no cérebro, seguido pelos testículos, ovários, fígado, coração e pulmão. Como é uma apolipoproteína, presume-se que sua função está relacionada à solubilização e transporte de lípidos no compartimento plasmático. A *APOJ* tem muitas similaridades com outra apolipoproteína envolvida no transporte de lípidos, a *APOE*. Ambas estão presentes praticamente nos mesmos tecidos em humanos, no plasma e em compartimentos separados do plasma por uma barreira fisiológica, como a barreira hematoencefálica. Entretanto, o transporte dos lípidos para as

células ocorre através de ligação com receptores de membrana, que são específicos para cada proteína. Acredita-se que a *APOE* e a *APOJ* transportem lípidos através dos mesmos tecidos, mas para células diferentes ou em resposta a estímulos diferentes (Silva, H; Harmony, J et al, 1990). Os lípidos são abundantes no tecido nervoso e, como são insolúveis, precisam estar ligados a proteínas solúveis, formando um complexo solúvel, a lipoproteína. A principal proteína transportadora do colesterol no cérebro é a apolipoproteína E. Entretanto, há diferenças entre as isoformas da *APOE*. A *APOE* ϵ_4 não é tão eficiente no transporte de colesterol para os neurônios, quanto a *APOE* ϵ_3 e, também, é menos eficiente na depuração de $A\beta$ (Hollingworth P, 2010). Polimorfismos no gene da *APOE*, que resultam na diminuição da expressão destes genes, estão associados com aumento na quantidade de placas/depósitos amilóides e em maior risco de desenvolver DA (Lambert and Amouyel, 2011)

De fato, em relação ao envolvimento na Doença de Alzheimer, a *Clusterin* se assemelha à *APOE* em muitos aspectos. Em pacientes com DA, a expressão da *CLU* aumenta nas áreas corticais afetadas e, assim como a *APOE*, está presente nas placas amilóides e no líquido (Hollingworth P., Harold D. et al, 2010). A proteína beta-amilóide é um dos ligantes tanto da *CLU* quanto da *APOE*. Estas duas apolipoproteínas estão envolvidas no “clearance” da $A\beta$ do cérebro, favorecendo a endocitose ou transportando-a através da barreira hematoencefálica (Bell et al., 2007), especialmente da forma mais tóxica, o peptídeo $A\beta_{42}$ (DeMattos R.B. et al., 2004).

A *Clusterin* é uma proteína que apresenta isoformas nuclear, citoplasmática e secretada. Não se sabe ao certo o papel das formas citoplasmática e nuclear, mas sabe-se que a forma secretada tem propriedades de chaperona extracelular (Jones, Jomary, 2002). Chaperonas são proteínas auxiliares, moléculas que auxiliam as proteínas recém-formadas a assumirem a configuração apropriada ao desempenho de suas tarefas e encaminham proteínas defeituosas para destruição (Wilson, MR., 2007).

Dois estudos *Genome Wide Association*, publicados em 2009, demonstraram que o gene codificador da *Clusterin* estava associado ao risco para doença de Alzheimer, assim como os genes codificadores do *CR1* (*Complement Receptor 1*) e do *PICALM* (*Phosphatidylinositol-Binding Clathrin Assembly Protein*) (Lambert J.C. et al, 2009) e (Harold D. et al, 2009). Devido à relação funcional com a *APOE*, o gene da *Clusterin* ou *APOJ*, já havia sido estudado como gene candidato na DA. Entretanto, esses estudos que mostraram uma potencial associação entre a *CLU* e o risco para DA apresentaram baixa

credibilidade, devido ao tamanho das amostras e a outros problemas metodológicos (Bertram, L e Tanzi, R, 2010).

Por sua vez, os trabalhos de Lambert (2009) e de Harold (2009), são considerados mais robustos, pois o número de indivíduos avaliados foi bastante expressivo (Lambert $n=7.360$, $OR=0,86$, $p=7,5 \times 10^{-9}$; Harold, $n=16.000$, $p= 1,4 \times 10^{-9}$) e houve replicação dos resultados principais nos dois estudos, de forma independente. Através da metodologia de estudo de associação por varredura de genoma ou simplesmente GWAS, somente o gene da *CLU* mostrou associação significativa estatisticamente ($p < 5 \times 10^{-8}$).

Além disso, estudos mostraram que os níveis de *Clusterin* estavam aumentados no plasma e no líquido de pacientes com DA (Yerbury J., Wilson M., 2009) (Schrijvers E. et al, 2011). Observou-se que os níveis plasmáticos eram mais elevados na DA rapidamente progressiva, mostrando que níveis altos de *Clusterin* estavam associados tanto com a presença da doença, quanto com a gravidade, sugerindo que a *CLU* poderia ser um marcador para a doença de Alzheimer. Este dado, porém, necessita de maiores investigações (Hardy J., Guerreiro R., Lovestone S., 2011).

Em suma, a *Clusterin* é uma chaperona que tem como alvo proteínas geradas por estresse, prevenindo disfunção orgânica em trauma grave. Na DA, a expressão da *Clusterin* está claramente aumentada, principalmente nos astrócitos. Esta proteína liga-se aos peptídeos β -amilóides e tem a capacidade de estabilizá-los em condições normais. (inibição da oligomerização da $A\beta$). Todavia, na presença de excesso de produção de $A\beta$, a *clustering* pode ter efeito contrário, aumentando a agregação da $A\beta$.

Além disso, tem ação de mediar a depuração destes peptídeos do cérebro. Quando a $A\beta$ forma filamentos, a *Clusterin* é capaz de mascará-los, impedindo o reconhecimento deles pelo sistema imunológico, prevenindo a resposta inflamatória excessiva. Exerce, ainda, uma ação neuroprotetora, através da inibição da ativação do sistema de complemento e, em caso de morte neuronal, participa da eliminação de “debris” celulares. A *CLU* é uma proteína multifuncional com ação neuroprotetora e anti-inflamatória (“guardião cerebral”), protegendo-o contra o acúmulo e toxicidade da $A\beta$, mas não parece ser capaz de evitar as alterações neuropatológicas progressivas encontradas cronicamente na Doença de Alzheimer (Nuutinen T. et al, 2009).

1.8 Sinergismo entre *CLU* e *APOE*

A *CLU* ou *APOJ* atua, conjuntamente com a *APOE*, na homeostasia do colesterol no SNC. Ambas são lipoproteínas abundantemente distribuídas no cérebro e atuam no transporte de colesterol necessário para o remodelamento das membranas celulares durante o *turnover* sináptico e a reorganização dendrítica (Leduc V., Jasmin-Belanger S., Poirier J., 2010). O colesterol é um componente essencial das membranas e bainhas de mielina, indispensável para a manutenção da integridade sináptica e função neuronal (plasticidade neuronal). A *APOE* e a *APOJ* são responsáveis pela solubilização dos lípidos e sua utilização pelas células neuronais e da glia. Além disso, atuam de forma cooperativa na estrutura, toxicidade e acúmulo do peptídeo β amilóide no SNC, pois funcionam como chaperonas chaves na regulação da conversão da $A\beta$ para formas insolúveis e, conseqüentemente, no *clearance* e deposição da $A\beta$ no cérebro (DeMattos R.B. et al, 2004). A *APOJ* é considerada uma via acessória e complementar da *APOE*. Desta forma, a deficiência destas apolipoproteínas poderia causar um efeito sinérgico na acumulação e agregação da β amilóide nas placas senis e no líquido. Níveis de apolipoproteína E parecem ser inversamente proporcionais à presença do alelo *épsilon 4*. Homozigotos para o alelo *épsilon 4* terão níveis menores de *APOE* do que os heterozigotos. Contrariamente, os níveis de *clusterin* estão proporcionalmente aumentados na presença do alelo *épsilon 4*, sugerindo um efeito indutor da *clusterin* em indivíduos com baixos níveis de *APOE* (Bertrand P., 1995).

1.9 Complement Receptor 1 (*CR1*)

O gene do *Complement Receptor 1 (CR1)* é encontrado no cromossomo 1 e codifica o receptor do complemento 1. Está predominantemente envolvido na imunidade adaptativa e é expresso abundantemente nos eritrócitos, mas, também, nos neurônios e células da glia, como astrócitos, micróglia e oligodendrócitos (Crehan H., 2011). Faz parte da membrana plasmática e é capaz de mediar a ligação da célula a partículas e imunocomplexos que ativam o sistema do complemento (Hollingworth P. et al, 2010). O sistema de complemento é composto de 30 proteínas que atuam na defesa do hospedeiro e na regulação do processo inflamatório (Morgan and Gasque, 1996). A via do complemento pode favorecer potencialmente a depuração da beta-amilóide e de células apoptóticas (Lambert e Amouyel, 2011).

O *CR1* é um receptor de superfície celular do complemento e, atualmente, há evidências convincentes que ocorre ativação desse sistema em doenças

neurodegenerativas, como doença de Alzheimer (Brouwers, 2012). A expressão aumentada dos fatores da via clássica do complemento foi observada em cérebros de pacientes com DA, onde a presença de placas neuríticas e emaranhados neurofibrilares foi capaz de ativar o sistema do complemento. Os eritrócitos são capazes de sequestrar a $A\beta_{42}$ e favorecer a sua depuração, via *CR1*. Na DA este mecanismo se encontra prejudicado (Rogers, J et al, 2006).

Sabe-se também que os componentes da cascata do complemento, como C1q e C3, selecionam sinapses indesejáveis para eliminação durante o desenvolvimento neuronal. Desta forma, variações do *CR1* poderiam ativar de forma inadequada o sistema do complemento, acelerando a perda sináptica (Masliah et al, 2001).

Os *loci* de risco do *CR1* para DA, *rs6656401* e *rs3818361*, foram descobertos no GWAS de 2009, onde foi demonstrado que o *rs6656401* teve o maior risco associado com DA de início tardio, com um *odds ratio* de 1,19 e um valor de *p* de $9,8 \times 10^{-8}$. O *rs3818361* mostrou associação apenas nos portadores do alelo $\epsilon 4$ da *APOE* (Lambert et al, 2009).

Estudos confirmaram que variações no gene do *CR1* desempenham um importante papel na Doença de Alzheimer de início tardio em uma população chinesa (Zangh et al, 2010), estão associadas com níveis elevados de $A\beta_{1-42}$ no líquido (Browers et al, 2011) e com alterações na espessura do hipocampo, córtex entorrinal e substância branca à ressonância magnética (Biffi et al, 2010), que são características da doença.

Foi demonstrado, também, que o SNP *rs6656401* do *CR1* apresentou associação com angiopatia amilóide cerebral e hemorragia intracerebral decorrente desta angiopatia, influenciando o risco e a recorrência de hemorragia, assim como a gravidade da deposição amilóide vascular (Biffi, A et al, 2012).

O significado funcional dos dois referidos SNPs do *CR1* ainda é pouco conhecido. São necessários mais estudos para investigar o papel desses polimorfismos na Doença de Alzheimer.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

- Avaliar a existência de associação entre os polimorfismos dos genes da *Clusterin (CLU)* e do Receptor 1 do Complemento (*CR1*) no binômio depressão-demência em idosos brasileiros.

2.2 Objetivos Específicos:

- Avaliar a associação entre os polimorfismos do gene da *Clusterin* na demência de Alzheimer;
- Avaliar a associação entre os polimorfismos do gene da *Clusterin* na depressão maior;
- Avaliar a associação entre o polimorfismo do *CR1* na demência de Alzheimer e na depressão maior.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Desenho do estudo

Foi realizado um estudo observacional transversal com 501 indivíduos com idade acima de 60 anos. Os participantes foram separados em três grupos distintos: controles, pacientes portadores de depressão maior, pacientes portadores de demência de Alzheimer de início tardio. Os grupos foram comparados com relação aos dados sócio-demográficos, variáveis clínicas e polimorfismos genéticos.

Os indivíduos selecionados são provenientes de dois serviços especializados no atendimento de pacientes com demência: Núcleo de Geriatria e Gerontologia da UFMG e Serviço de Neurologia da Santa Casa de Misericórdia de Minas Gerais. Ambos os serviços são referência em diagnóstico e tratamento de transtornos de memória em Belo Horizonte e utilizam o mesmo protocolo de avaliação dos pacientes.

O Núcleo de Geriatria e Gerontologia da UFMG congrega todas as atividades de ensino, pesquisa e extensão associadas ao envelhecimento na UFMG, desde 1996. Dentre as atividades de extensão, destaca-se o atendimento de idosos realizados no Instituto Jenny de Andrade Faria, responsável pelo Programa de Atenção à Saúde do Idoso do HC-UFMG, considerado referência no Brasil. Trata-se de um serviço multiprofissional de assistência integrada a idosos, que prioriza o atendimento de idosos frágeis e portadores de síndromes demenciais. Em 2002, o centro foi credenciado como o primeiro Centro de Referência em Atenção ao Idoso do Estado de Minas Gerais (Portaria GM/MS nº 703 /2002). É responsável pela implementação do Programa de Assistência aos Portadores da Doença de Alzheimer (Portaria nº 843, de 2002) em Minas Gerais, permitindo o acesso gratuito à medicação específica. Realiza aproximadamente 1.000 atendimentos por mês. As especialidades médicas disponíveis são geriatria, psicogeriatria, clínica médica, reumatologia, otorrinolaringologia, oftalmologia, patologia clínica, medicina paliativa e acupuntura e as especialidades não médicas são enfermagem, fisioterapia, terapia ocupacional, fonoaudiologia, serviço social, farmácia, nutrição, neuropsicologia, odontologia e musicoterapia. Em setembro de 2010, o Instituto Jenny de Andrade Faria assumiu a implementação do Programa Mais Vida em Belo Horizonte, tornando-se o Centro Mais Vida da Macroregião Centro I. O programa é um projeto prioritário do Governo de Minas Gerais que tem como finalidade melhorar a qualidade de vida da pessoa idosa. Para tanto, busca oferecer um padrão de excelência nas ações de saúde, de modo que a população tenha longevidade com autonomia e independência.

O Ambulatório de Demências do Serviço de Neurologia da Santa Casa de Misericórdia de Minas Gerais atende principalmente pacientes com suspeita de incapacidade cognitiva. Também é responsável pelo diagnóstico e tratamento destes pacientes.

Os centros de referência recebem pacientes encaminhados pelos serviços de atenção primária. O agendamento das consultas é realizado através da Central de Marcação da Secretaria Municipal de Saúde de BH. No período do estudo também ocorreram três “Cursos-Mutirões de Distúrbios da Memória e Demências” promovidos pelo Instituto Jenny de Andrade Faria. Os indivíduos que apresentaram alterações cognitivas ou psiquiátricas em uma avaliação simplificada, realizada inicialmente, eram encaminhados para avaliação geriátrica completa no Centro de Referência do Idoso.

3.2 Seleção da amostra

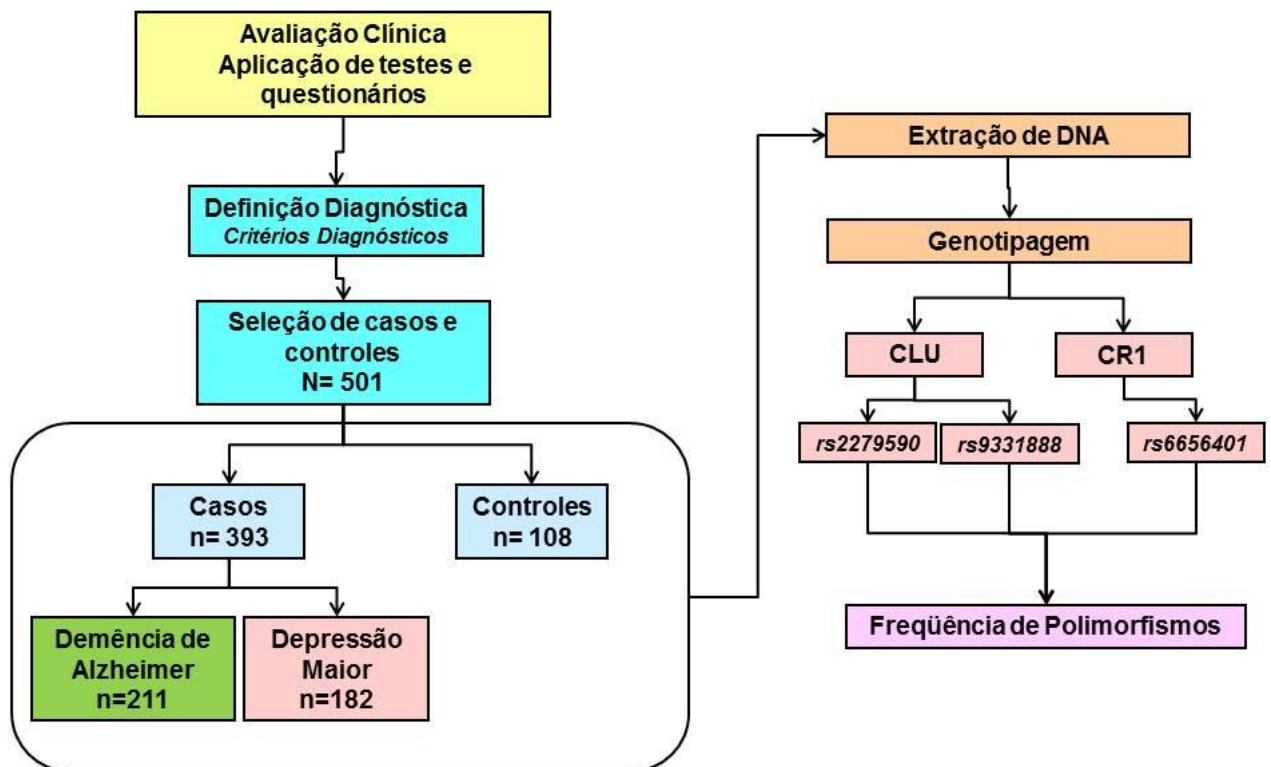
Os participantes foram selecionados em dois períodos distintos: de janeiro de 2005 a julho de 2006 e de outubro de 2007 a dezembro de 2009.

A seleção aleatória dos participantes foi realizada por profissionais capacitados para a realização da avaliação cognitiva. Os casos eram discutidos e revistos periodicamente pelas equipes de geriatria, psicogeriatría e de neuropsicologia.

Para assegurar a validade psicométrica do estudo foi realizado o treinamento dos avaliadores que aplicaram os instrumentos. Os pesquisadores foram responsáveis pelo treinamento na aplicação dos testes e na pontuação de escores dos instrumentos específicos. Uma vez treinados, a confiabilidade dos novos avaliadores foi estabelecida por comparação com avaliadores experientes. Assuntos concretos relacionados à avaliação foram discutidos em reuniões semanais, com a participação dos investigadores responsáveis pela aplicação dos instrumentos específicos e da equipe clínica responsável pelos pacientes.

Após aplicação dos testes diagnósticos, os indivíduos foram divididos em três grupos: controle (108 indivíduos), portadores de depressão maior (182 indivíduos) e portadores de Demência de Alzheimer (DA) de início tardio (211 indivíduos). O fluxograma da figura 04 mostra os grupos de pacientes.

Figura 04: Fluxograma de seleção dos indivíduos para o estudo.



Os indivíduos pertencentes ao grupo controle foram criteriosamente selecionados entre pacientes em acompanhamento clínico nos mesmos Centros de Atenção ao Idoso. Estes indivíduos realizavam controle clínico em função de outras condições médicas. Foram considerados como controles, indivíduos com ausência de história pessoal, atual e pregressa, e história familiar - em parentes de primeiro grau - de doenças neuropsiquiátricas. Para exclusão de doenças psiquiátricas, eles foram submetidos ao *Mini-international Neuropsychiatric Interview* (MINI-PLUS) versão em português (Amorim P, 2000). O MINI-PLUS é uma entrevista psiquiátrica estruturada de curta duração desenvolvida para aplicação em triagem clínica multicêntrica e estudos epidemiológicos (Sheeran e cols., 1998).

O diagnóstico de Transtorno Depressivo Maior foi realizado baseado nos critérios do DSM IV e da Escala de Depressão Geriátrica (GDS) validada em português (Sheikh & Yesavage, 1986; Almeida & Almeida, 1998). Foi considerado 5/15 o ponto de corte para o diagnóstico de depressão através do GDS. Foram excluídos pacientes que apresentavam outros transtornos psiquiátricos associados, sintomas depressivos secundários ao luto e a

condições clínicas e/ou medicamentosas e indivíduos portadores de doenças neurológicas, como Doença de Parkinson, Coreia de Huntington, epilepsia, passíveis de associações com os polimorfismos genéticos selecionados para estudo.

Seguindo as recomendações do Departamento Científico de Neurologia Cognitiva e do Envelhecimento da Academia Brasileira de Neurologia, o diagnóstico de demência foi feito baseado nos critérios da APA (DSM IV) e o diagnóstico de Demência de Alzheimer provável baseado nos critérios da National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke e Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA) (Anexo 1). Foram selecionados apenas indivíduos portadores de Doença de Alzheimer de início tardio. Foram excluídos pacientes portadores de outros tipos de demência.

Na tabela 02 listamos a bateria de testes utilizados para o diagnóstico de Doença de Alzheimer. Estes testes são parte integrante dos protocolos utilizados nos centros de diagnóstico para liberação de medicamentos excepcionais da Secretaria Estadual de Saúde do Estado de Minas Gerais e são essenciais para a dispensação dos anticolinesterásicos padronizados para o tratamento de DA. Além dos testes clínicos foram realizados exames complementares para exclusão de outras possíveis causas de demência e avaliação de indicação e contra-indicações da terapêutica. A avaliação por neuroimagem, através de tomografia computadorizada ou ressonância nuclear magnética, foi realizada nos casos em que havia indicação clínica para investigação de outras etiologias para a síndrome demencial, de demência mista ou de complicações (associadas ou não à DA), como hematoma subdural.

Tabela 2
Bateria de testes cognitivos e de transtornos psiquiátricos utilizada nos
Centros de Atenção ao Idoso

Avaliação cognitiva e dos transtornos psiquiátricos	
Mini mental	Folstein e cols., 1975; Brucki e cols., 2003.
Fluência verbal	Brucki e cols., 1997
Lista de palavras CERAD	Morris e cols., 1989; Bertolucci e cols., 1998.
Reconhecimento de figuras	Nitrini e cols., 1994
Teste do relógio	Nitrini e cols., 1994
Inventário neuro-psiquiátrico	Cummings e cols., 1994
Escala de demência clínica (CDR- <i>Dementia Rating</i>)	<i>Clinical</i> Morris e cols., 1993
<i>Frontal and Assessment Battery</i> (FAB)	Dubois e cols., 2000
Avaliação funcional Pfeffer	Pfeffer e cols., 1982
Avaliação funcional Lawton	Lawton&Brody, 1969
Avaliação funcional Katz	Katz e cols., 1963; Lino e cols., 2008
Critérios diagnósticos para depressão	DSM IV
GDS	Almeida&Almeida, 1998 Amorim P, 2000

Para excluir demências de causas reversíveis são realizados exames complementares como TSH, ácido fólico, vitamina B12, uréia, creatinina, VDRL, anti-HIV, avaliação de funções hepática e renal, conforme avaliação clínica. Outros exames complementares são solicitados de acordo com a indicação clínica.

Todos os indivíduos portadores de depressão de início tardio e demência foram acompanhados durante um período mínimo de dois anos. Os controles foram rigorosamente selecionados.

Foram excluídos indivíduos com história de outras doenças neuropsiquiátricas, incluindo doença de Parkinson; portadores de síndromes demenciais que não preencheram critérios para DA; indivíduo com evidência de retardo mental ou transtorno importante de desenvolvimento.

Todos os indivíduos foram submetidos à avaliação geriátrica completa (Anexo 2), através do Protocolo de Avaliação Multidimensional do Idoso (disponível no site: www.hc.ufmg.br/geriatria/pdf/protocolo_avaliacao_idoso.pdf). Além disso, realizamos revisão de prontuário de todos os casos.

3.3 Variáveis analisadas

3.3.1 Dados sócio-demográficos:

Foram avaliados dados como: idade (em anos), gênero (masculino ou feminino) e escolaridade, através do levantamento do número de anos de estudo de cada participante.

3.3.2 Dados sobre a Demência de Alzheimer

Foram excluídos todos os casos com suspeita de demência mista (demência de Alzheimer associada a demência vascular). Foram incluídos apenas pacientes portadores de demência de Alzheimer. O Mini Exame do Estado Mental (MEEM) foi utilizado para caracterização da amostra de todos os pacientes avaliados.

3.3.3 Dados sobre a depressão maior

Foram incluídos no estudo portadores de transtorno depressivo maior de início precoce ou tardio.

3.3.4 Dados sobre os participantes pertencentes ao grupo controle:

A idade dos participantes pertencentes ao grupo controle foi calculada em relação à data de avaliação e aplicação dos testes.

Foram avaliados os mesmos fatores sócio-demográficos, clínicos (MEEM) e genéticos dos pacientes pertencentes aos outros grupos.

3.3.5 Variáveis genéticas:

Foram analisados os polimorfismo da *CLU* e do *CR1*.

- *CLU*: rs2279590 e rs9331888;
- *CR1*: rs6656401

3.4 Considerações éticas

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais – parecer ETIC 334/06 (Anexo 3). Cada potencial participante foi orientado quanto aos procedimentos envolvidos no trabalho - incluindo potenciais riscos e benefícios, possíveis implicações dos resultados encontrados e contato com os pesquisadores. Quanto aos participantes pertencentes ao grupo DA, estas orientações foram feitas ao familiar ou responsável legal, com posterior assinatura do termo de consentimento, uma vez que estes pacientes não respondem juridicamente pelos atos assumidos. Durante este processo, os pesquisadores enfatizaram quanto à liberdade para decidir pela não participação e para abandonar o estudo a qualquer momento. Após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, os participantes foram submetidos às entrevistas e coleta de material biológico (sangue).

Quanto à coleta de sangue, feita para uso em experimentos de genética, o risco potencial está associado à dor, equimose no local da punção e, em raras ocasiões, tonturas e infecção. A coleta foi realizada por profissional treinado, em local apropriado e com material adequado, reduzindo assim os riscos aos participantes.

Durante todo o estudo foi mantido o sigilo das informações do paciente. Todos os registros são codificados com um identificador para evitar cruzamento entre os dados. Em nenhum momento o nome de um paciente é associado aos materiais de estudo. Apenas os pesquisadores responsáveis diretos pelo trabalho têm acesso aos dados clínicos e resultados dos procedimentos laboratoriais realizados.

3.5 Genotipagem

3.5.1 Extração de DNA a partir de leucócitos pelo método de solução salina concentrada

Após exame clínico, todos os participantes foram submetidos à coleta de aproximadamente 10 mililitros de sangue venoso periférico em tubos contendo o anti-coagulante EDTA. Posteriormente o DNA genômico foi extraído dos leucócitos a partir do sangue total por meio do método de solução salina concentrada (Lahiri et al., 1991)

O método de extração encontra-se detalhado no Anexo 5 (Miller e cols., 1988).

3.5.2 Polimorfismos estudados

Os polimorfismos foram escolhidos através do Projeto Internacional *HapMap* (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>) e através de dados da literatura, com evidências significativas de associação dos polimorfismos com o risco para DA.

3.5.3 PCR em tempo real (*Real time PCR*)

O *Real time PCR* (PCR em tempo real) é uma técnica de biologia molecular baseada na reação de PCR convencional que é usada para amplificar e, simultaneamente quantificar a molécula alvo de DNA. Possibilita tanto a detecção quanto a quantificação de uma ou mais seqüências específicas de amostra de DNA.

O procedimento segue os mesmos princípios gerais do PCR. Diferente do PCR convencional onde o produto da reação é detectado ao final da reação, no *Real time PCR* o DNA é detectado enquanto a reação progride em tempo real.

Utilizamos a técnica de detecção dos produtos de DNA através de sondas (*probes*) específicas que consistem de oligonucleotídeos ligados a um revelador fluorescente que permite a detecção somente após hibridização da sonda (*probe*) com a fita de DNA complementar. Desta forma, a sonda fluorescente aumenta significativamente a especificidade e possibilita a quantificação do DNA (Livak e cols., 1995).

Para estudo dos polimorfismos dos genes *CLU* e *CR1* realizamos a genotipagem através de PCR em tempo real. Foram selecionados três tagSNPs que foram genotipados utilizando o kit *TaqMan*® SNP Genotyping Assays (*Applied Biosystems*, E.U.A.) e sondas de genotipagem adquiridas pela empresa de biotecnologia *Applied Biosystems*. As sondas utilizadas correspondem aos seguintes SNPs, conforme tabela 03:

Tabela 03 Sondas dos polimorfismos avaliados

Nome do Gene	SNP e Código da sonda	Localização	Sequência do Polimorfismo [VIC/FAM]	Alelo Ancestral	Tipo
<i>CR1</i>	<i>rs6656401</i> C__30033241_10	Cr 1 205758672	TTTCCTTCTCTGTCTCCATCTTCTC[A/G]T CGCCTTCTCCTCTGTGTGTGTCCT	G	INTRON
<i>CLU</i>	<i>rs2279590</i> C__1842470_20	Cr 8 27512170	CTTCTGATAAGGAAGTCCTCCTGCT[C/T]C TCCAAGGAAACCTAGAGAGCTGAC	C	INTRON
<i>CLU</i>	<i>rs9331888</i> C__1522425_10	Cr 8 27524779	GGAGCAGGCTTCCCAGAGAAAGTCC[C/G] TTTGAAGGATGAGTCCTCTTGCTC	G	INTRON

O Protocolo de PCR seguiu as instruções de utilização da genotipagem TaqMan® Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA).

A reação de PCR foi preparada com 3,5µl do Mix, 3,4µl de água deionizada 0,1µl de sonda 1,0µl de DNA (50ng/µl), para um volume total de 8µl. As sondas foram fornecidas pela *Applied Biosystems Inc.* (Foster, CA). A reação de PCR em tempo real foi realizada com: 1 ciclo desnaturação a 95°C (10 min a 95 °C) e 50 ciclos de anelamento e extensão (15 segundos a 95 °C e 1 minuto a 60 °C). As reações foram realizadas em equipamento de PCR em tempo real (*Stratagene Mx3005, La Jolla, CA*).

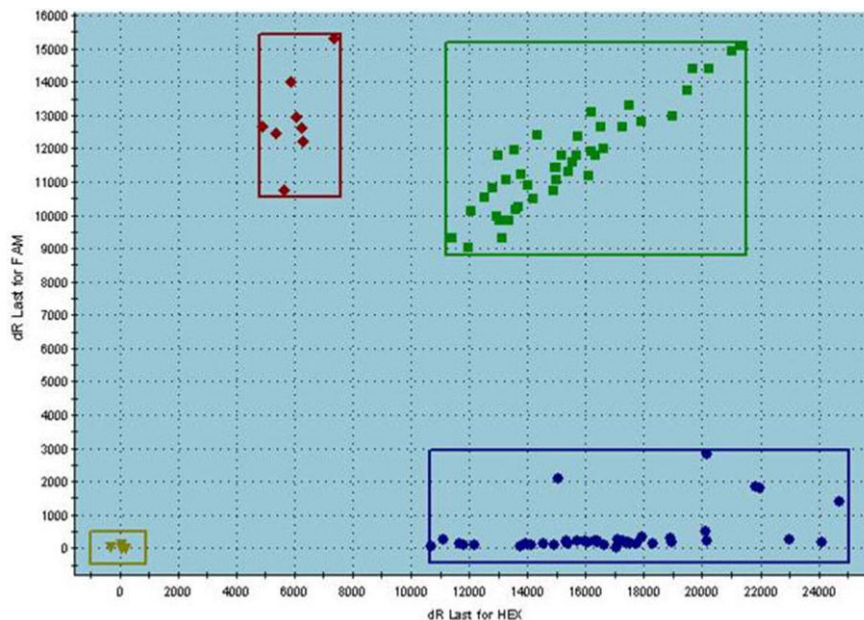
Os produtos das reações de PCR foram analisados no modo de discriminação de alelos no mesmo equipamento. A discriminação dos alelos foi obtida (*MxPro QPCR-Software, 2007*).

Para controle da qualidade dos nossos resultados, o procedimento foi repetido em 10% da amostra selecionada aleatoriamente. Em cada placa com 96 amostras havia pelo menos três controles negativos para cada marcador utilizado. Os resultados foram analisados e comparados por pelo menos dois observadores diferentes.

3.5.4 Ensaios de *TaqMan*

O *TaqMan*[®] é um tipo de ensaio fornecido pela ABI (*Applied Biosystems Inc., Foster, CA*). Nesse estudo, na forma *made-to-order*, constituído por dois pares de oligonucleotídeos: *forward* e *reverse* (oligonucleotídeos na concentração de 900 µM), um marcador - 1 VIC[®] dye – detecta a presença do alelo 1 (marcadores com concentração final de 200 µM), um marcador 2 FAM[®] dye – detecta a presença do alelo 2 (marcadores com concentração final de 200 µM). A figura 05 mostra o resultado de PCR em tempo real.

Figura 05: Resultado de PCR em tempo real.



Fluorescências: FAM em vermelho; VIC em azul e em verde o heterozigoto. Em amarelos, os controles negativos.

3.6 Análise Estatística

As informações coletadas foram inseridas em um banco de dados desenvolvido utilizando-se o software *Access*® versão 2007 e os dados, posteriormente foram exportados para o *Excel*®. Os resultados descritivos apresentados foram obtidos utilizando frequências e porcentagens para as características das variáveis analisadas.

As análises estatísticas dos dados após genotipagem para alelos isolados, genotípica, haplotípica e de 1000 permutações foram realizadas com o programa *Unphased* 3.0.13 (Dudbridge F., 2008). O programa *Haploview* 4.2 (www.broad.mit.edu/mpg/haploview) foi utilizado para avaliar a abrangência do gene e sua representatividade através do desequilíbrio de ligação e o equilíbrio de Hardy-Weinberg. O nível de significância considerado foi $p < 0,05$.

A análise dos resultados das genotipagem foi realizada através de análise univariada utilizando o *qui-quadrado* para avaliar a associação entre os alelos e genótipos do *CR1* e *CLU* (análise de haplótipos). Utilizamos os softwares *Unphased* versão 3.0.13 (www.mrc-bsu.cam.ac.uk/personal/frank/software/unphased/) e *Haploview* 4.2 (<http://www.broadinstitute.org/>) para análise de frequências genotípica e alélica. Para verificação da veracidade dos resultados, foi aplicada análise de permutação em todos os modelos.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização da amostra

A amostra é constituída por **501 indivíduos** que foram divididos de acordo com o diagnóstico em três grupos: controle (108 indivíduos), demência de Alzheimer (211 indivíduos) e depressão maior (182 indivíduos). Foi realizada a genotipagem para todos os participantes.

Com relação às características sócio-demográficas e clínicas (Tabela 04), a amostra apresentou as seguintes características: a média de idade foi de 78 anos, 80 anos e 76 anos nos grupos controle, demência de Alzheimer e depressão, respectivamente. Em todos os grupos houve predomínio do sexo feminino e a escolaridade variou de 03 anos, no grupo de pacientes, a 4,2 anos, no grupo controle. A média do Mini Exame do Estado Mental (MEEM) foi de 13 pontos (Demência de Alzheimer), 23 pontos (Depressão) e 26 pontos (Controle).

Tabela 04
Descrição da Amostra

Variável	CONTROLE (n=108)	PACIENTES	
		DEMÊNCIA DE ALZHEIMER (n=211)	DEPRESSÃO (n=182)
Idade (anos)	78 (65 a 99)	80 (65 a 100)	76 (65 a 104)
Sexo	♀75 (69%) ♂33 (31%)	♀ 135 (64%) ♂ 76 (36%)	♀148 (81%) ♂34 (19%)
Escolaridade (anos)	4,2 (0 a 16)	3 (0 a 16)	3 (0 a 13)
MEEM	26 (15 a 30)	13 (0 a 23)	23 (13 a 30)

4.2 Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (HWE)

Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* afirma que, em uma população mendeliana, dentro de determinadas condições ideais, as frequências gênicas permanecerão inalteradas e as proporções genóticas atingiriam um equilíbrio estável, mantendo-se constante ao longo das gerações. Independentemente de um gene ser raro ou freqüente, sua frequência permanecerá a mesma com relação aos outros, desde que essas condições sejam mantidas. As condições necessárias para se manter o *HWE* são: a população é grande; os casamentos são aleatórios; todos os membros da população são igualmente férteis; não há efeito de seleção natural; não há taxas de mutações apreciáveis; não ocorrem mutações gerando novos alelos.

Foi realizada avaliação para equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (HWE) em toda a amostra para os dois SNPs *rs227959* e *rs933188* da *CLU* e *rs6656401* do *CR1* e observou-se que todos estavam em equilíbrio.

4.3 Resultados da Genotipagem

Com relação aos polimorfismos estudados, realizamos análise da distribuição alélica, distribuição genotípica, haplótipos entre os SNPs da *CLU* e análise da distribuição alélica e genotípica para o SNP do *CR1*. O nível de significância estatístico considerado foi $p < 0,05$. Todos os SNPs apresentaram um alelo de menor frequência maior que 10%, o que indica uma boa penetrância dos alelos na população (Tabela 05).

Tabela 05
Alelos de menor frequência para cada SNP nos grupos avaliados

Gene/SNP	Polimorfismo	Alelo Ancestral	Alelo de menor frequência	MAF* DA x Controle	MAF Depressão x Controle
<i>CR1</i>					
<i>rs6656401</i>	A/G	G	A	0,140	0,149
<i>CLU</i>					
<i>rs2279590</i>	C/T	C	T	0,296	0,322
<i>CLU</i>					
<i>rs9331888</i>	C/G	G	G	0,260	0,296.

MAF*: Alelo de menor frequência

Na análise alélica, no grupo Alzheimer x Controle, o SNP *rs2279590* da *CLU* mostrou associação do alelo ancestral C com Demência de Alzheimer ($OR= 1,52$, $X^2= 5,453$ e $p= 0,01$). Contudo, quando o resultado foi ajustado após 1.000 permutações, a significância não foi mantida. Para os outros marcadores, não houve nenhuma associação com Demência de Alzheimer (Tabela 06).

Tabela 06

Análise da associação alélica dos polimorfismos dos genes *CR1* e *CLU*
em DA (n = 211) x Controle (n = 108)

	Alelo	DA n (%)	Controle n (%)	OR	CI (95%)	Chi sq χ^2	p	p ajustado
CR1								
rs6656401	G	362 (87%)	161 (83%)	0,70	(0,43 - 1,12)	2,175	0,1403	
	A	52 (13%)	33 (17%)					
CLU								
rs2279590	C	307 (73%)	138 (64%)	1,52	(1,06 - 2,17)	5,453	0,01954	0,09*
	T	111 (27%)	76 (36%)					
rs9331888	G	106 (25%)	59 (27%)	0,90	(0,62 - 1,31)	0,283	0,5947	
	C	312 (75%)	157 (73%)					

*p ajustado após 1.000 permutações (Unphased)

Na análise genotípica para o grupo Demência de Alzheimer x Controle, foi observada associação do genótipo homozigoto (C/C) para o SNP *rs2279590* do *CLU*, como risco para DA ($OR = 2$, $X^2 = 5,12$ e $p = 0,02$) por ter sido mais frequente nos casos. Após o ajustamento com 1000 permutações, o nível de significância não foi mantido. Para os demais marcadores, neste grupo, não foi encontrada nenhuma associação (Tabela 07)

Tabela 07

Análise da associação genotípica dos polimorfismos dos genes *CR1* e *CLU* em DA x Controle

SNP	Genótipo	DA n (%)	Controle n (%)	OR	CI (95%)	Chi sq χ^2	p
CR1	G/G	161 (78%)	67 (69%)			2,67	0,10
rs6656401	A/G	40 (19%)	27 (28%)	0.61	(0.35 - 1.08)	2,785	0,09
	A/A	6 (3%)	3 (3%)	0.83	(0.20 - 3.42)	0,008	0,92
CLU							
rs2279590	C/C	116 (55%)	45 (42%)	2,005	(0.92 - 4.36)	5,12	0,02*
	C/T	75 (36%)	48 (45%)	0,60	(0,55 - 2,66)	2,398	0,12
	T/T	18 (9%)	14 (13%)			1,555	0,21
rs9331888							
	G/G	17 (8%)	7 (6%)			0,2779	0,59
	C/G	72 (35%)	45 (42%)	0,65	(0,25 - 1,71)	1,593	0,20
	C/C	120 (57%)	56 (52%)	0,88	(0.34 - 2.24)	0,8928	0,34

*p ajustado após 1000 prmutações = 0,09

Nas análises alélicas e genotípicas para todos os marcadores, no grupo Depressão x Controle, não foi encontrada nenhuma associação (Tabela 08 e Tabela 09).

Tabela 08
Análise da associação alélica dos polimorfismos dos genes *CR1* e *CLU*
em Depressão (n = 182) x Controle (n = 108)

	Alelo	Depressão n (%)	Controle n (%)	OR	CI (95%)	Chi sq χ^2	p
CR1							
rs6656401	G	312 (86%)	161 (83%)	0,78	(0,48 - 1,26)	1,017	0,31
	A	50 (14%)	33 (17%)				
CLU							
rs2279590	C	254 (70%)	138 (64%)	0,78	(0,54 - 1,12)	1,731	0,18
	T	110 (30%)	76 (36%)				
rs9331888	G	112 (31%)	59 (27%)	0,83	(0,57 - 1,21)	0,853	0,37
	C	250 (69%)	157 (73%)				

Tabela 09
Análise da associação genotípica dos polimorfismos dos genes *CR1* e *CLU* em
Depressão x Controle

SNP	Genótipo	Depressão n (%)	Controle n (%)	OR	CI (95%)	Chi sq χ^2	p
CR1							
rs6656401	G/G	136 (75%)	67 (69%)	0,72	(0,41 - 1,28)	1,18	0,27
	A/G	40 (22%)	27 (28%)			1,136	0,28
	A/A	5 (3%)	3 (3%)			0,024	0,87
CLU							
rs2279590	C/C	93 (51%)	45 (42%)	0,68	(0,41 - 1,14)	2,209	0,13
	C/T	68 (37%)	48 (45%)			1,576	0,20
	T/T	21 (12%)	14 (13%)			0,151	0,69
rs9331888	G/G	21 (11%)	7 (6%)	0,51	(0,20 - 1,31)	2,027	0,15
	C/G	70 (39%)	45 (42%)			0,2528	0,61
	C/C	90 (50%)	56 (52%)			0,1225	0,72

A análise haplotípica foi feita, utilizando-se o programa *Haploview 4.2* (Fig. 6).

Figura 6
Desequilíbrio de Ligação entre dois SNPs

Esta figura indica a associação (desequilíbrio de ligação - LD) entre dois marcadores. O



losango representa o grau de recombinação entre apenas dois SNPs. As cores aumentam de intensidade, variando do branco ao vermelho vivo, conforme a diminuição de recombinação entre os marcadores. O vermelho vivo indica assim, uma baixa recombinação alélica (um alto LD) entre os dois marcadores que o representam. O programa de análise *Haploview 4.2* indica através de cores a relação entre os polimorfismos selecionados dentro da população estudada.

A análise obtida pelo *Haploview 4.2* apresentou os polimorfismos em baixo desequilíbrio de ligação, portanto, sem apresentar bloco haplotípico entre os SNPs do *CLU* (D' : 0,543; r^2 : 0,04). Este programa apresenta como cofatores estatísticos o D' e o r^2 , que representam a recombinação em função do número amostral e da distância entre os marcadores.

O estudo de desequilíbrio de ligação (LD) é usado para identificar regiões do genoma que contêm genes que predisõem doenças e que apresentam grande probabilidade de serem herdados juntos (Horikawa, 2000).

Foi realizada, também, a análise de haplótipos, utilizando-se o programa *Unphased* (Dudbridge F, 2008) entre os *rs2279590* e *rs933188* do gene da *CLU*, somente no grupo Alzheimer x Controle, já que, para o grupo Depressão x Controle, não foi encontrada nenhuma associação nas análises anteriores.

Esta análise haplotípica mostrou que o haplótipo C-C dos SNPs (*rs22790590* e *rs9331888*) foi mais frequente nos casos que nos controles ($OR = 1,23$, $p = 0,02$). O haplótipo C-T (*rs9331888* e *rs2279590*) foi significativamente mais frequente em controles, quando comparados aos casos ($OR = 0,77$ e $p = 0,03$), sugerindo um efeito protetor. Após o ajustamento com 1000 permutações, o nível de significância não foi mantido. Para outros haplótipos, não houve associação (Tabela 10).

Tabela 10
Haplótipos do gene *CLU*

Haplótipo	Frequência nos Casos n=211	Frequência nos Controles n=108	OR	χ^2	<i>p</i>
SNPs Haplótipos (<i>rs2279590</i> , <i>rs9331888</i>)					
CG	0,22	0,22	1	0,011	0,91
CC	0,51	0,41	1,23	5,295	0,02*
GT	0,029	0,045	0,62	2,085	0,14
CT	0,23	0,31	0,77	4,342	0,03*

**p* ajustado após 1000 permutações = 0,09.

5. DISCUSSÃO

O envelhecimento representa a maior conquista da humanidade. Todavia, traz grandes desafios para as sociedades contemporâneas, pois constitui o principal fator de risco para doenças crônico-degenerativas e incapacidades (Camarano A.A., Lima-Costa M.F., 2008).

Na população idosa brasileira observa-se predomínio das mulheres, fenômeno conhecido com “feminização da velhice”. Segundo o censo de 2010 (IBGE), a população idosa feminina é de 11.434.487, enquanto a masculina corresponde a 9.156.112. Na amostra estudada, observou-se maior número de mulheres, tanto no grupo dos casos (72%), quanto no controle (69%). A proporção de mulheres e homens foi significativamente maior no grupo de pacientes com depressão, onde a relação foi de 4,35 mulheres para cada homem. Este achado é descrito na literatura, que mostra franco predomínio de depressão nas mulheres (Thakur M., Blazer D.G., 2008). Fenômeno semelhante foi também observado no grupo de pacientes com doença de Alzheimer, mas com menor intensidade (1,77 : 1). Sabe-se, também, que a DA é mais frequente entre as mulheres (Kukull, WA; Ganguli, M, 2000).

Em relação à escolaridade encontrou-se uma média de três anos de escolaridade para o grupo de pacientes com demência de Alzheimer e depressão, o que coincide com o observado na população idosa brasileira, em que a média de escolaridade é de três anos (IBGE, 2010). No grupo controle, a média de escolaridade foi maior (4,2 anos), possivelmente devido à seleção deste grupo de indivíduos, recrutados, principalmente, de grupos de terceira idade e/ou dos mutirões de avaliação de memória realizados regularmente no Núcleo de Geriatria e Gerontologia da UFMG.

Entre as doenças crônico degenerativas associadas ao envelhecimento, destaca-se a doença de Alzheimer, forma mais comum de demência, responsável por 60% dos casos. A DA compromete significativamente a autonomia e independência do indivíduo e está associada a sobrecarga do cuidador, da família e do sistema de saúde, pois acarreta gastos excessivos (Sperling, R. et al, 2011).

Nas últimas décadas, foram feitos grandes avanços na compreensão da etiopatogenia e no diagnóstico da Demência de Alzheimer. Atualmente, o diagnóstico é realizado com 90% de acurácia em centros de pesquisa de Doença de Alzheimer (DeKosky ST, 2003). O próximo desafio é tornar médicos não especialistas capazes de realizar o diagnóstico da doença (Carrilo, MC, 2009). Em estudo recente (Ravic, 2011), o tempo médio entre o aparecimento dos primeiros sintomas de declínio cognitivo e o

diagnóstico de DA foi de 1,5 anos. A principal causa de atraso diagnóstico foi a não suspeição clínica, pois a maioria dos pacientes havia sido avaliada por, pelo menos, dois médicos. Habitualmente, as alterações cognitivas são atribuídas ao envelhecimento normal e não são devidamente valorizadas tanto pela família, quanto pelos profissionais de saúde. O diagnóstico precoce da doença permite a implementação do tratamento específico e de medidas de prevenção de acidentes, que variam desde acidentes domésticos até perdas financeiras significativas. O tratamento farmacológico é eminentemente sintomático, e, até o momento, não dispomos de drogas capazes de modificar o curso da doença. Cerca de 10 a 20% dos pacientes apresentam melhora importante da cognição, do comportamento ou do desempenho nas atividades de vida diária com o uso dos anticolinesterásicos, associados ou não à memantina.

A tendência atual é a busca do diagnóstico nas fases pré-clínicas da doença, em que terapias modificadoras serão mais eficazes (Dubois, B, 2007). A doença de Alzheimer apresenta um período longo de evolução que antecede em anos ou décadas o aparecimento da sintomatologia típica da doença. Sperling e cols, em 2011, descreveram as fases pré-clínicas da doença, onde já podem ser observadas alterações etiopatogênicas da doença (Estágio 1: Amiloidose assintomática) e/ou alterações neurodegenerativas (Estágio 2: Amiloidose + Neurodegeneração), ainda insuficientes para causar qualquer repercussão clínica. No estágio 3, já podem ser observadas discretas alterações cognitivas, ainda insuficientes para o diagnóstico de comprometimento cognitivo leve (Amiloidose + Neurodegeneração + Declínio cognitivo sutil). Na fase pré-clínica da doença, o diagnóstico depende da identificação de biomarcadores adequados, que sejam custo eficazes, para serem usados de rotina em indivíduos assintomáticos (Hansson O., 2006). No momento, ainda não dispomos de nenhuma terapia modificadora da doença, mas os avanços científicos na área são significativos (Galimberti D., 2012).

O biomarcador ou marcador biológico é definido como uma característica objetivamente mensurável, capaz de indicar processos biológicos normais, doenças e/ou resposta terapêutica. Na doença de Alzheimer, um biomarcador é uma medida laboratorial capaz de refletir a fisiopatologia da doença. São esquematicamente divididos em biomarcadores de estado, de progressão e genéticos. Os biomarcadores de estado refletem evidências fisiopatológicas da DA, como a redução da $A\beta_{42}$ no líquido, PET amilóide positivo (PiB), aumento da proteína *Tau* e *Tau* fosforilada (*p-Tau*) no líquido, Por sua vez, os biomarcadores de progressão refletem a evolução e gravidade da doença e são representados pela presença de hipometabolismo neuronal, observado pela redução

da captação do FDG (*Fluorodeoxyglucose - PET*) e pela atrofia cortical progressiva na região têmporo-parietal medial (Ressonância magnética estrutural). Por fim, os biomarcadores genéticos representam fatores de risco para a DA e não são modificáveis. Incluem a apolipoproteína E (*APOE ε4*), *APOJ (CLU-Clusterin)*, *CR1*, entre outros (Cummings J, 2011).

A importância dos biomarcadores no diagnóstico da DA foi, recentemente, reforçada com os novos critérios diagnósticos do NINCDS-ADRDA (McKhann, 2011), que incluiu os biomarcadores de estado, de progressão e genéticos nos critérios diagnósticos. Por exemplo, a presença de evidência de mutações genéticas específicas como *APP*, *PSEN1* e *PSEN2* aumentam o grau de certeza diagnóstica. Outros biomarcadores genéticos, como a *APOE* não apresentam valor diagnóstico nesta nova classificação.

A forma mais comum da DA, a de início tardio, tem um forte componente hereditário, estimado em cerca de 79%, mas é geneticamente complexo (Gatz et al, 2006) (Hollingworth, P et al, 2010). Até recentemente, o gene da apolipoproteína E era o único gene associado ao risco para LOAD (Saunders e cols, 1993) (Corder et al, 1993). Em 2009, foram publicados dois grandes estudos multicêntricos (*Genome Wide Association Studies*) (Lambert J.C. e cols, 2009) (Harold D. et al, 2009) que identificaram novos genes candidatos, particularmente o gene da *Clustering (CLU)* e do *CR1 (Complement Receptor 1)*. Os mecanismos de associação desses genes com o risco de desenvolvimento de DA ainda não estão completamente esclarecidos. As associações observadas são consideradas significativas e conclusivas.

A *Clustering* é uma proteína multifuncional com ação neuroprotetora e anti-inflamatória (Nuutinen, T et al, 2009), responsável pela potencial estabilização e depuração dos peptídeos β-amilóides do cérebro (inibição da oligomerização da Aβ), em condições normais. O efeito da *clusterin* é dependente da *APOE*. Ambas tem ação cooperativa na deposição e depuração da proteína β amilóide no SNC. Os níveis de apolipoproteína E são inversamente proporcionais à presença do alelo ε4, com níveis de *APOE* mais baixos nos homozigotos (ε4/ε4) quando comparados com aos heterozigotos. Contrariamente, os níveis de *clusterin* aumentam proporcionalmente na presença do alelo ε4, sugerindo um efeito indutor da *clusterin* nos indivíduos com baixos níveis de *APOE* (Bertrand P. et al, 1995). Todavia, na presença do alelo ε4 ocorre excesso de produção de Aβ e a *clustering* pode ter efeito contrário, aumentando a agregação da Aβ (Wilson M.R. et al, 2008).

O gene da *CLU* é um forte candidato ao envolvimento na doença, com uma fração de risco atribuível de 8,9%, enquanto o risco para a *APOE* é de 25,5%. Por sua vez, o

gene *CR1* apresentou risco atribuível de 3,8% (Lambert et al, 2009). Os resultados desses estudos foram replicados em populações diferentes de forma independente (Chen L.H. et al, 2012) (Carrasquillo M.M. et al, 2010) (Seshadri S. et al, 2010) (Yu, J.T. et al, 2010), confirmando a associação. Todavia, alguns estudos não observaram a associação proposta (Guerreiro R. et al, 2010) (Komatsu M et al, 2011).

Como a população brasileira é etnicamente diferente e ainda não há dados sobre associação destes novos genes com o risco para DA nesta população, optou-se por avaliar o risco associado aos polimorfismos dos genes da *CLU* e do *CR1* em uma amostra da população brasileira.

Nosso estudo avaliou dois SNPs da *CLU*, *rs2279590* e *rs9331888*, e encontrou uma associação estatisticamente significativa entre o alelo ancestral C e do genótipo C/C do SNP *rs2279590* do gene da *CLU* nos pacientes com doença de Alzheimer de início tardio, quando comparados com o grupo controle ($p=0,01$). A análise haplotípica encontrou dois haplótipos associados ao risco de DA. O haplótipo C-C foi mais frequente nos casos que nos controles ($OR = 1,23$, $p = 0,02$) e o haplótipo C-T foi significativamente mais frequente em controles, quando comparados aos casos ($OR = 0,77$ e $p = 0,03$). Estes achados sugerem que o alelo ancestral C do *rs2279590* esteja relacionado com maior risco para DA e que o alelo mutante T deste mesmo SNP tenha um efeito protetor no risco de desenvolvimento da doença. Podemos inferir que a mutação trouxe benefícios para a espécie humana, na medida em que está associada a redução do risco de DA.

Todavia, com o ajuste da comparação após 1.000 permutações, a significância estatística não se manteve, apesar de mostrar uma tendência de associação ($p=0,09$). Esta associação estatística questionável pode ser atribuída ao tamanho insuficiente da amostra, como foi observado no estudo de Komatsu M. et al (2011), onde foram avaliados 180 pacientes portadores de DA e 120 controles. Não foi encontrada associação alélica e nem genotípica para o *rs9331888* entre o grupo de pacientes com DA e os controles.

Em relação ao SNP do *CR1* *rs6656401* não foi encontrado nenhum tipo de associação com a DA. Este achado poderia ser explicado pelo número reduzido da amostra, uma vez que a associação entre o *CR1* e o risco de DA é mais fraca, quando comparado com o *CLU*.

Os resultados aparentemente negativos desta amostra podem ser resultantes da diferença de etnia entre a população brasileira e as populações anteriormente avaliadas. Mais estudos brasileiros serão necessários para a avaliação destes novos genes candidatos, utilizando-se maior número de indivíduos.

Na depressão maior, não encontramos nenhuma associação com os genes avaliados. Realmente, a literatura não mostra associação clara entre os genes estudados e o risco de depressão, tampouco em relação à APOE (Fiske A. et al). Todavia, sabe-se que a depressão maior representa um fator de risco para doença de Alzheimer. Pode-se supor que a presença de genes associados ao risco para DA, em pacientes portadores de depressão, possa prever uma maior taxa de conversão para a doença de Alzheimer.

As principais limitações do estudo foram o tamanho da amostragem e a impossibilidade da utilização de outra sonda do gene da *CLU* (*rs11136000*), avaliada na maioria dos estudos. Além disso, a genotipagem da *APOE* poderia enriquecer a avaliação das relações existentes entre os dois genes, responsáveis pela codificação das principais chaperonas envolvidas no metabolismo da proteína β -amilóide.

O estudo dos biomarcadores genéticos na doença de Alzheimer pode ser útil para compreensão da fisiopatologia, para realização do diagnóstico da doença mais precocemente e para a busca de novos agentes terapêuticos, capazes de impedir ou retardar a evolução desta doença cada vez mais frequente nos idosos. O estudo de outros biomarcadores relacionados à DA e depressão no idoso, como a neuroimagem funcional (*PET* com *FDG*) e biomarcadores inflamatórios, são linhas de pesquisa resultantes da parceria exitosa entre o Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Medicina Molecular e o Núcleo de Geriatria e Gerontologia da UFMG.

Seria interessante dar continuidade ao estudo dos biomarcadores genéticos descritos para a doença de Alzheimer, correlacionando-os com outros biomarcadores, no intuito de compreender melhor a fisiopatologia da doença e suas implicações diagnósticas e terapêuticas. Além disso, a definição destes biomarcadores poderia ser útil para o esclarecimento dos preditores de risco da conversão de depressão em demência nos idosos

6. CONCLUSÃO

O estudo encontrou uma associação de risco para a doença de Alzheimer entre o alelo ancestral C ($p=0,01$) e o genótipo C/C do *rs2279590* ($p=0,02$) do gene codificador da *Clusterin (CLU)*. A análise haplotípica para os SNPs da *CLU* (*rs22790590* e *rs9331888*) mostrou uma associação entre o haplótipo C-C e o risco para DA, por ter sido encontrado com maior frequência nos casos (OR 1,23; $p=0,02$). Por sua vez, o haplótipo C-T foi significativamente mais frequente nos controles (OR 0,77, $p=0,03$), sugerindo um efeito protetor. Todavia, estas associações não foram mantidas após o ajustamento com 1.000 permutações, o que se deveu, possivelmente, ao tamanho da amostra. Não houve associação alélica, nem genotípica, entre o SNP *rs9331888* da *CLU* e o SNP *rs6656401* do *CR1* com a doença de Alzheimer. Para depressão, não houve associação com nenhum dos biomarcadores genéticos avaliados.

7. REFERÊNCIAS

1. ALEXOPOULOS G.S. Depression in the elderly. *Lancet*, v.365, p.1961-1970, 2005;
2. ALMEIDA O.P., ALMEIDA A.A. Confiabilidade da versão brasileira da escala de depressão geriátrica (GDS) versão reduzida. *Arq Bras Neuro-Psiq*, v.57, p.421-426, 1988;
3. AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 4th edition. Washington: American Psychiatric Association, 1994;
4. AMORIM P. MINI International Neuropsychiatric Interview (MINI): validation of a short structured diagnostic psychiatric interview. *Rev Bras Psiquiatr*, v.22, p.106-15, 2000;
5. BALLARD C. Alzheimer's Disease. *Lancet*, v.377, p.1019-1031, 2011;
6. BELL RD, Sagare AP, et al., Transport pathways for clearance of human Alzheimer's amyloid beta-peptide and apolipoproteins E and J in the mouse central nervous system. *J Cereb Blood Flow Metab*, v. 27, p. 909-918, 2007;
7. BERTOLUCCI P.H.F. et al. Desempenho da população brasileira na bateria neuropsicológica do Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). *Rev Psiq Clin*, v.2, p.80-83, 1998;
8. BERTRAM L., TANZI R.E. Alzheimer's Disease: new light on old *CLU*. *Nat Rev Neurol*, v. 6, p. 11-13, 2010;
9. BERTRAND P., POIRIER J., ODA T., FINCHE C.E., PASINETTI G.M. Association of APOE Genotype with brain levels of APOE and APOJ (Clusterin) in Alzheimer Disease. *Brain Res Mol*, V33, P. 174-178, 1995;
10. BICALHO, M.A.C. Estudo dos polimorfismos funcionais dos genes *BDNF*, *COMT*, *5HTT* e *APOE* no binômio depressão-demência no idoso. Tese (Doutorado em Farmacologia Bioquímica e Molecular). Universidade Federal de Minas Gerais, 2010;

11. BLAZER D.G., HYBELS C.F. Origins of depression in later life. *Psychological Medicine*, v.35, p.1241-1252, 2005;
12. BIFFI A, et al. Genetic variation and neuroimaging measures in Alzheimer's disease. *Arc Neurol*, v. 67, p.677-685, 2010;
13. BIFFI A. et al. Genetic variation at CR1 increases risk of cerebral amyloid angiopathy. *Neurology*, v.78, p.334-341, 2012;
14. BROUWERS N. et al. Alzheimer risk associated with a copy number variation in the complement receptor 1 increasing C3b/C4b binding sites. *Molec Psychiatry*, v.17, p.223-33, 2012;
15. BRUCKI S.M.D. et al. Sugestões para o uso do Mini-Exame do estado mental no Brasil. *Arq Neuropsiquiatr*, v.61, p.777-781, 2003;
16. BRUCKI S.M.D., MALHEIROS S.M.F., OKAMOTO I.H., BERTOLUCCI P.H.F. Dados normativos para o teste de fluência verbal categoria animais em nosso meio. *Arq Neuropsiquiatr*, v.55, p.56-61, 1997;
17. BOTTINO C.M.C., AZEVEDO J.R.D., TATSCH M. Estimate of Dementia Prevalence in a community sample of from São Paulo, Brazil. *Dement Geriatr Cogn Disord*, v.26, p.291-299, 2008;
18. CAMARANO A.A., LIMA-COSTA M.F. Demografia e Epidemiologia do Envelhecimento no Brasil. In: MORAES E.N. *Princípios Básicos de Geriatria e Gerontologia*, Coopmed, cap. 01, p.3-19, 2008;
19. CARRILLOA M.C.; BLACKWELLB A.; HAMPELC H. Early risk assessment for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, v.5, p.182-196, 2009;
20. CHEN L.H. et al. Polymorphisms of CR1, CLU and PICALM confer susceptibility of Alzheimer's disease in a southern Chinese population. *Neurobiology of Aging*, v.33, p.210e1-210e7, 2012;

21. CREHAN H., HOLTON P., WRAY S, POCOCK J., GUERREIRO R., HARDY J. Complement receptor 1 (CR1) and Alzheimer's disease. *Immunobiology*, v.217, p.244-250, 2012;
22. CHERTKOW H. Diagnosis and treatment of dementia: Introducing a series based on the Third Canadian Consensus Conference on the Diagnosis and Treatment of Dementia. *CMAJ*, v.178, p.316-321, 2008;
23. CUMMINGS J.L., MEGA M., GRAY K., ROSENBERG-THOMPSON S., CARUSI D.A., GORNBEIN J. Neuropsychiatric Inventory: comprehensive assessment of psychopathology in dementia. *Neurology*, v.44, p.2308-2323, 1994;
24. DEMATTOS R.B., CIRRITO J.R. et al. ApoE and clusterin cooperatively suppress Abeta levels and deposition: evidence that ApoE regulates extracellular Abeta metabolism in vivo. *Neuron*, v. 41, p. 193-202, 2004;
25. DUBOIS B., SLACHVSKY A., LITVAN I., PILLON B. The FAB: a Frontal and Assessment Battery at bedside. *Neurology*, v.55, p.1621-1626, 2000;
26. DUDBRIDGE F. Likelihood-based association analysis for nuclear families and unrelated subjects with missing genotype data. *Human Heredity*, v.66, p87-98, 2008;
27. FOLSTEIN MF, FOLSTEIN SE, MCHUGH PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 1975, v.12(3), p.189-98, 1975;
28. FEDLMAN H.H.; JACOVA C.; ROBILLARD A. Diagnosis and treatment of dementia: 2. Diagnosis. *CMAJ*, v.178, p.825-835, 2008;
29. FISKE A., WETHERELL J. L., GATZ M. Depression in older adults. *Annu Rev Clin Psychol*, v.5, p.363-389, 2009,
30. GALIMBERTI D.; SCARPINI E. Progress in Alzheimer's disease. *J Neurol*, v.259, p.259-201, 2012;

31. GONZALEZ H.M., VEJA W.A., WILLIAMS D.R., TARRAF W., WEST B.T., NEIGHBORS H.W. Depression care in United States. *Arch Gen Psychiatry* **67**:37-46, 2010;
32. GOLTSEY-DUBNER T., GALIL-WEISSTUB E., SEGMAN R.H. Genetics of Unipolar Major Depressive Disorder. *Isr J Psychiatry Relat Sci*, v.47, p.72-82, 2010;
33. HARDY J., GUERREIRO R., LOVESTONE S. Clustering as an Alzheimer biomarker. *Arc Neurol*, v.68, p.1459-60, 2011;
34. HAROLD D., ABRAHAM R., HOLLINGWORTH P. et al. Genome Wide Association Study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nature Genetics*, v. 41, p. 1088-93, 2009;
35. HERRERA J.R., CARAMELLI P., SILVEIRA A.S.B. Epidemiologic Survey of Dementia in a Community-Dwelling Brazilian Population. *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, v.16, p.103-108, 2002;
36. HOLLINGWORTH P.; HAROLD D.; HAROLD L.; OWEN M.J.; WILLIAMS J. Alzheimer's disease genetics: current knowledge and future challenges. *Intern J Geriat Psychiatry*, 26:793-802, 2010;
37. HORIKAWA Y., ODA N., COX N.J., LI X., ORHO-MELANDER M., HARA M., HINOKIO Y., LINDNER T.H., MASHIMA H., SCHWARZ P.E., DEL BOSQUE-PLATA L., HORIKAWA Y., ODA Y., YOSHIUCHI I., COLILLA S., POLONSKY K.S., WEI S., CONCANNON P., IWASAKI N., SCHULZE J., BAIER L.J., BOGARDUS C., GROOP L., BOERWINKLE E., HANIS C.L., BELL G.I. (2000) Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet*, v.26, p.163-75, 2000;
38. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em www.ibge.gov.br. Acesso em 15 fev 2012;
39. JONES S.E., JOMARY C. Clusterin. *Int J Biochem Cell Biol*, v.34, p.427-431, 2002;

40. KATZ S., FORD A.B., MOSKOWITZ R.W. Studies of illness in the aged. The index of ADL: a standardized measure of biological and psychosocial function. *JAMA*, v.185, p.914-9, 1963;
41. KOMATSU M., SHIBATA N., KUERBAN B. et al. Genetic association between clusterin polymorphisms and Alzheimer's disease in a Japanese population. *Psychogeriatr*, v.11, p.14-18, 2011;
42. KRYCH-GOLDBERG M., MOULDS J.N., ATKINSON J.P. Human Complement Receptor type 1 (CR1) binding to malarial adhesion. *Trends in Molecular Medicine*, v.8, p.531-537, 2002;
43. KUKULL, W. A., GANGULI, M., *Epidemiology of Dementia: concepts and overview. Neurologic Clinics*, v. 18, p. 923-949, 2000;
44. Kupfer D.J. Long-term treatment of depression. *J Clin Psychiatry*, v.52, p.28-34, 1991;
45. LAMBERT J.C., AMOUYEL P. Genetics of Alzheimer's disease: new evidences for an old hypothesis? *Current Opinion in Genetics & Development*, 21:295-301, 2011;
46. LAMBERT J.C., HEATH S. et al. Genome Wide Association Study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nature Genetics*, v. 41, p. 1094-99, 2009;
47. LAWHORNE L. Depression in the Older Adult. *Prim Care Clin Office Pract*, v.32, p.777-792, 2005;
48. LAWTON M.P., BRODY E.M. Assessment of older people: self-maintaining and instrumental activities of daily living. *Gerontologist* 1969;v.9, p.179-86, 1969;
49. LESCH K.P. Gene-environment interaction and genetics of depression. *Rev Psychiatr Neurosci*, v.29, p.174-184, 2004;

50. LAHIRI, D.K., NURNBERGER, J.I. J. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res*, v.19, p.5444, 1991;
51. LINO V.T.S. et al. Adaptação transcultural da Escala de Independência em Atividades de Vida Diária (Escala de Katz). *Cad Saúde Pública*, v.24, p.103-112, 2008;
52. LOHOFF F.W. Overview of the Genetic of Major Depressive Disorder. *Curr Psychiatry Rep*, v.12,p.539-546, 2010;
53. LOTRICH F.E. Gene-Environment Interactions in Geriatric Depression. *Psychiat Clin N Am*, v.34, p.357-736, 2011;
54. LOPES M.A., HOTOTIAN S.R., AZEVEDO J.R. Prevalence of dementia and Alzheimer's disease in Ribeirão Preto, Brazil: A community survey in ederly population. In: 12th International Meeting of the International Psychogeriatric Association, 2005, Stocolmo. *International Psychogeriatrics*,, v.17, p.210-210, 2005;
55. LOUISE M. R.; MACLULLICH A.M.J. Subjective Memory Complaints and Cognitive Impairment in Older People. *Dement Geriatr Cogn Disord*, v. 22, p.471–485, 2006;
56. MCKHANN G., DRACHMAN D., FOLSTEIN M., KATZMAN R., PRICE D., STADLAN E.M. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*, v. 34, p.939-944,1984;
57. MCKHANN G.M., KNOPMAN D.S., CHERTKOW H., HYMAN B.T., JACK C.R., KAWAS C.H. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging and the Alzheimer's Association workgroup. *Alzheimer & Dement*, v.7, p.263–269, 2011;

58. MASLIAH E., MALLORY M., ALFORD M. et al. Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease. *Neurology*, v. 56, p.127-129, 2001;
59. MIRANDA, L.F.J.R., CARAMELLI P., MORAES E.N. Delay in the diagnosis of Alzheimer's disease. *Dementia & Neuropsychologia*. , v.5, p.328 - 331, 2011;
60. MORGAN K. The three new pathways leading to Alzheimer's Disease. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, v.37, p.353-357, 2011;
61. MORGAN B.P., GASQUE P. Expression of complement in the brain: role in health and disease. *Immunology Today*, v.17, p.461-466, 1996;
62. MOUSSAVI S., CHATTERJI S., VERDES E., AJAY T., PATEL .V, USTUN. Depression, chronic diseases, and decrements in health: results from the World Health Surveys, *Lancet*, v.370, p.851-8, 2007;
63. MENDES, E. V. As redes de atenção à saúde. Belo Horizonte, ESP-MG, 2009;
64. MILLER S.A., DYKES D.D., POLESKY H.F. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res*, v.16, p.1215, 1998;
65. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DNCT) no Brasil, 2011;
66. MORAES E.N., LANNA F.M. Incapacidade cognitiva: abordagem diagnóstica e terapêutica das demências no idoso, Belo Horizonte, Folium, 2010;
67. MORRIS J.C., MOHS R.C., HUGHES J.P., VAN BELLE G., FILLENBAUM G., MILLITS E.D., CLARK C. The Consortium to establish a registry for Alzheimer's disease. *Neurology*, v.39, p.1159-1165, 1989;

68. MORRIS J.C. The Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules. *Neurology*, v.43, p.2412-2414, 1993;
69. NITRINI R., BOTTINO C.M.C., ABDALA, C. Prevalence of dementia in Latin America: a collaborative study of population based cohorts. *International Psychogeriatrics*, v.21, p.622-630, 2009;
70. NITRINI R., CAMELLI P., BOTTINO C.M.C. Diagnóstico de Doença de Alzheimer no Brasil. Avaliação cognitiva e funcional. *Arq Neuropsiquiatr*, v.63, p.720-727, 2005;
71. NITRINI R et al. Testes neuropsicológicos de aplicação simples para o diagnóstico de demência. *Arq Neuropsiquiatr*, v.52, p.456-465, 1994;
72. NOWRANGI M.A., RAO V., LYKETSOS C.G. Epidemiology, Assessment e treatment of Dementia. *Psychiat Clin N Am*, v. 34, p.275-294, 2011;
73. NUUTINEN T. et al. Clusterin: a forgotten player in Alzheimer's disease. *Brain Res Rev*, v.61, p.89-104, 2009;
74. PATTERSON C.; FEIGHTNER J.W.; GARCIA A. Diagnosis and treatment of dementia: 1. Risk assessment and primary prevention of Alzheimer disease. *CMAJ*, v.178, p. 548-56, 2008;
75. PARADELA E.M.P., LOURENÇO R.A., VERAS R.P. Validation of Geriatric Depression Scale in a general outpatient clinic. *Rev Saúde Pública*, v.39, p.918-923, 2005;
76. PEREIRA P.A., ROMANO-SILVA M.A., BICALHO M.A.C., DE MARCO L., CORREA H., CAMPOS S.B., MORAES E.N., TORRES K.C.L., SOUZA B.R., MIRANDA D.M. Association Between Tryptophan Hydroxylase – 2 Gene and Late – Onset Depression. *Am J Geriatr Psychiatry*, v.19, p. 825-829, 2011;

77. PFEFFER RI, KUROSAKI TT, HARRAH CH e cols. "Measurement of functional activities in older adults in the community" *Journal of Gerontology*, v.37, p.323-329, 1982;
78. QUENFURTH H.W., LaFERLA F.M. Mechanisms of disease: Alzheimer's Disease. *NEJM*, v.363, p.329-344, 2010;
79. QIU C., RONCHE D., FRATIGLIONI L. The epidemiology of the dementias: an update. *Curr Opin Psychiatry*, v.20, p.380-385, 2007;
80. ROGERS J. et al. Peripheral clearance of amyloid beta peptid by complement C3-dependent adherence to erythrocytes. *Neurobiol Aging*, v.27, p.1733-1739, 2006;
81. ROSSOR M.N. The diagnosis of young-onset dementia. *Lancet Neurol*, v.9, p.793-806, 2010;
82. SCHMIDT M.I.; DUNCAN B.B.; SILVA G.A.; MENEZES A.M.; MONTEIRO C.A.; SANDY M.B. et al. Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges. *Lancet*, v.377, p.1949-1961, 2011;
83. SCHRIJVERS E.M., et al. Plasma clusterin and the risk of Alzheimer's disease. *JAMA*, v.305, p.1322-26, 2011;
84. SHEIKH J.L., YESAVAGE J.A. Geriatric depression scale (GDS): recent evidence and development of a shorter version. In: BRINK TL. *Clinical gerontology: guide to assessment and intervention*. Haworth, New York. 163-173, 1986;
85. SHEEHAN D.V., LECRUBIER Y., SHEEHAN K.H., AMORIM P., JANAVS J., WEILLER E., HERGUETA T., BAKER R., DUNBAR G.C. The Mini-International Neuropsychiatric Interview (M.I.N.I.): the development and validation of a structured diagnostic psychiatric interview for DSM-IV and ICD-10. *J Clin Psychiatry* v.59 [suppl 20], p.22-33, 1998;
86. SILVA H., HARMONY J. et al. Apolipoprotein J: Structure and Tissue Distribution. *Biochemistry*, v.29., p. 5380-89, 1990;
87. SKOOG I. Psychiatric epidemiology of old age: the H70 study – the NAPE lecture. *Acta Psychiatr Scand*, v.109, p.4-18, 2003;

88. SPERLING, R.A. et al. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's Disease: recommendations from the National Institute of Aging and the Alzheimer's Association Workgroup. *Alzheimer & Dementia*, v. 7, p. 208-292, 2011;
89. STRITTMATTER W.J. et al. Binding of human APOE to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late onset Alzheimer's Disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.90, p.8098-8102, 1993;
90. THAKUR M. ., BLAZER D.G. Depression in Long-Term Care, *J Am Med Dir Assoc*, v.9, p.82– 87, 2008;
91. URANI A., CHOUBAJI S., GASS P. Mutant mouse models of depression: candidate genes and current mouse lines. *Neurosci Biobehav Rev*, v.29, p.805-828, 2005;
92. WALDEMAR G.; DUBOIS B.; EMREC M.; GEORGESD J.; MCKEITHE I.G.; ROSSORF M.; SCHELTENSG P.; TARISKAH P. AND WINBLAD B. Recommendations for the diagnosis and management of Alzheimer's disease and other disorders associated with dementia: EFNS guideline. *European Journal of Neurology*, v.14, p.e1–e26, 2007;
93. WEISSMAN M.M., BLAND R.C., CANINO G.J., FARAVELLI C., GREENWALD S., HWU H.G., JOYCE P.R., KARAM E.G., LEE C.K., LELLOUCH J., LÉPINE J.P., NEWMAN S.C., RUBIO-STIPEC M., WELLS J.E., WICKRAMARATNE P.J., WITTCHEN H., YEH E.K. Cross-national epidemiology of major depression and bipolar disorder. *JAMA*, v.276, p.293-299, 1996;
94. WILSON M.R. et al. Potential roles of abundant extracellular chaperones in the control of amyloid formation and toxicity. *Mol Biosyst*, v.4, p.42-52, 2008;
95. WINGO T. Autosomal Recessive Causes Likely in Early-Onset Alzheimer Disease. *Arch Neurol*, v.69, p.59-64, 2012;
96. YAAR RI, COREY-BLOOM J. Alzheimer's disease. *Semin Neurol*, v.27, p.32–4, 2007;
97. YERBURY J., WILSON M. Extracellular chaperones modulate the effect of Alzheimer's patient cerebrospinal fluid on A β ₁₋₄₂ toxicity and uptake. *Cel Stress and Chaperones*, v.15, p.115-121, 2010;

98. YO J.T. et al. Implication of *CLU* gene polymorphisms in Chinese patients with Alzheimer's disease. *Clinica Chimica Acta*, v. 411, p.1516-1519, 2010;

8. ANEXOS

ANEXO 1

Critérios Diagnósticos de Demência (DSM IV) e NINCDS-ADRDA

Critérios diagnósticos para demência (DSM IV)

- A. Desenvolvimento de múltiplos déficits cognitivos manifestados tanto por (1) quanto por (2):
- 1- comprometimento da memória (capacidade prejudicada de aprender novas informações ou recordar informações anteriormente aprendidas)
 - 2- uma (ou mais) das seguintes perturbações cognitivas:
 - (a) afasia (perturbação da linguagem);
 - (b) apraxia (capacidade prejudicada de executar atividades motoras, apesar de um funcionamento motor intacto);
 - (c) agnosia (incapacidade de reconhecer ou identificar objetos, apesar de um funcionamento sensorial intacto);
 - (d) perturbação do funcionamento executivo (isto é, planejamento, organização, seqüenciamento, abstração);
- B. Os déficits cognitivos nos critérios A1 e A2 causam comprometimento significativo do funcionamento social ou ocupacional e representam declínio significativo em relação ao grau anteriormente superior de funcionamento;
- C. O curso caracteriza-se por um início gradual e um declínio cognitivo contínuo;
- D. Os déficits cognitivos nos Critérios A1 e A2 não se devem a quaisquer dos seguintes fatores:
- 1- outras condições do sistema nervoso central que causam déficits progressivos na memória e cognição (por ex., doença cerebrovascular, doença de Parkinson, doença de Huntington, hematoma subdural, hidrocefalia de pressão normal, tumor cerebral)
 - 2- condições sistêmicas que comprovadamente causam demência (por exemplo: hipotireoidismo, deficiência de vitamina B12 ou ácido fólico, deficiência de niacina, hipercalcemia, neurosífilis, infecção com HIV)
 - 3- condições induzidas por substâncias;
- E. Os déficits não ocorrem exclusivamente durante o curso de um delirium;
- F. A perturbação não é melhor explicada por um outro transtorno do Eixo I ¹(por ex., Transtorno Depressivo Maior, Esquizofrenia).

¹ Transtornos psiquiátricos do eixo I: O DSM-IV organiza cada condição psiquiátrica em cinco níveis (eixos), relacionados com os diferentes aspectos da doença:

- Eixo I: Desordens clínicas, incluindo as principais doenças mentais, como também desordens de desenvolvimento ou aprendizado. Inclui depressão, transtornos de ansiedade, distúrbio bipolar, transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDHD) e esquizofrenia;
- Eixo II: Condições invasivas e transtornos de personalidade, assim como retardo mental. Inclui: transtorno de personalidade *borderline*, transtorno de personalidade esquizotípica e transtorno de personalidade anti-social;
- Eixo III: Doenças mentais agudas e doenças físicas;
- Eixo IV: Fatores ambientais e psicossociais contribuintes com a doença;

Codificar com base no tipo de início e características predominantes:

- Com Início Precoce: se o início ocorre aos 65 anos ou antes;
 - 290.11 Com Delirium: se delirium está sobreposto à demência;
 - F00.01 - 290.12 Com Delírios: se delírios são a característica predominante;
 - F00.03 - 290.13 Com Humor Deprimido: se humor deprimido (incluindo apresentações que satisfazem todos os critérios de sintomas para um Episódio Depressivo Maior) é uma característica predominante. Excluir condições clínicas que justifiquem o quadro;
 - F00.00 - 290.10 Sem Complicações: se nenhuma das características acima predomina na apresentação clínica atual;
- Com Início Tardio: se o início ocorre após os 65 anos de idade;
 - 290.3 Com Delirium: se delirium está sobreposto à demência;
 - F00.11 - 290.20 Com Delírios: se delírios são a característica predominante
 - F00.13 - 290.21 Com Humor Deprimido: se humor deprimido (incluindo apresentações que satisfazem todos os critérios de sintomas para um Episódio Depressivo Maior) é uma característica predominante. Excluir condições clínicas que justifiquem o quadro;
- F00.10 - 290.0 Sem Complicações: se nenhuma das características acima predomina na apresentação clínica atual;
- Com Perturbação do Comportamento

Os critérios propostos pelo NINCDS-ADRDA (Tierney e cols., 1988) são categorizados da seguinte maneira:

- DA provável;
- DA possível;
- DA definitiva.

Critérios diagnósticos da NINCDS-ADRDA para o diagnóstico de Doença de Alzheimer:

I- DA provável:

- Presença de demência estabelecida por este teste objetivo, como mini-mental ou exame similar e confirmado por exame neuropsicológico;
- Prejuízo da memória e de pelo menos uma função cognitiva;
- Piora progressiva da memória e outras funções cognitivas;
- Ausência de distúrbio da consciência;
- Início entre os 40 e 90 anos, mas mais freqüente após 65 anos;
- Ausência de condições sistêmicas e/ou outra doença do Sistema Nervoso Central (SNC) que possa justificar o déficit de memória e cognitivo progressivo;
- O diagnóstico de DA provável é apoiado por:
 - Deterioração progressiva das funções cognitivas como linguagem, habilidades motoras e percepção;
 - Atividades do dia-a-dia prejudicadas e padrão de comportamento alterado;
 - História familiar de transtorno semelhante, particularmente se confirmado por exame neuropatológico;

-
- Eixo V: Avaliação global de funcionamento, ou (no caso dos menores de idade) avaliação global de funcionamento de crianças. As avaliações são feitas com base numa escala de 100 a zero.

- Líquido céfalo-raquidiano normal, quando avaliado pela técnica padrão;
- Eletroencefalograma normal ou com padrão inespecífico, como aumento da atividade das ondas lentas; evidência de atrofia cerebral progressiva em exames de neuro-imagem seriados;
- Outros achados clínicos consistentes com o diagnóstico de DA, após exclusão de outras causas de demência:
 - Platô no curso da doença;
 - Sintomas associados de depressão, insônia, incontinência, delusões, ilusões, halucinações, surtos de descontrole (verbal, emocional ou físico), mudanças no comportamento sexual e perda de peso;
 - Outras alterações neurológicas em fase avançada da doença: aumento do tônus muscular, mioclonia e desordens da marcha;
- Achados que tornam o diagnóstico de DA improvável ou incerto:
 - Início súbito ou apoplético;
 - Sinais neurológicos focais, como hemiparesias, perda sensorial ou de campo visual, e incoordenação no início da doença;
 - Convulsões e distúrbios da marcha no início ou muito precoce no curso da doença;

II- DA possível:

- Feita com base na síndrome demencial, na ausência de outras alterações neurológicas, psiquiátricas ou sistêmicas insuficientes para produzir demência, mesmo diante de variações de apresentação do início ou do curso clínico;
- Pode ser feito mesmo na presença de uma segunda alteração sistêmica ou cerebral suficiente para produzir demência, mas não considerada causa de quadro demencial presente;
- Pode ser usado em pesquisa clínica quando um único e gradual déficit cognitivo progressivo é documentado na ausência de outras causas identificáveis;

III- DA definitiva:

- Preenchimento dos critérios de provável DA com comprovação histopatológica de tecido cerebral por biópsia ou autópsia;

IV- Classificação:

- Ocorrência familiar ou genética;
- Início antes dos 65 anos;
- Presença de trissomia do cromossomo 21
- Coexistência de outras condições relevantes, como Doença de Parkinson.

ANEXO 2
Bateria de Avaliação dos Pacientes

TABELA 1 - Síntese da bateria de avaliação

A avaliação dos pacientes analisará os seguintes domínios:

1. Queixa principal
2. Revisão dos sistemas fisiológicos
3. Avaliação funcional:
 - a. Índice de Katz (Katz et al., 1963)
 - b. Escala de Lawton-Brody (1969)
4. Avaliação da Cognição:
 - a. Mini-Mental (Folstein et al., 1975)
 - b. Fluência verbal (Brucki et al., 1997)
 - c. Lista palavras do CERAD (Morris et al., 1989)
 - d. Reconhecimento de figuras (Nitrini et al., 1994)
 - e. Teste Relógio (Nitrini et al., 1994)
 - f. Inventário neuro-psiquiátrico (Cummings et al., 1994)
 - g. Escala de Demência Clínica (CDR)
5. Avaliação do Humor:
 - a. Escala Geriátrica de Depressão, versão simplificada (15);
 - b. Critérios de Depressão do DSM-IV.
6. História pregressa
7. Exame físico completo
8. Revisão laboratorial

ANEXO 03
Parecer do Conselho de ética em Pesquisa (COEP)

Universidade Federal de Minas Gerais
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP


Parecer nº. ETIC 334/06

Interessado: Prof. Marco Aurélio Romano Silva
Departamento de Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas-UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP, aprovou, *ad referendum*, no dia 29 de novembro de 2006, depois de atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "Abordagem multidisciplinar do binômio depressão-demência no idoso" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do referido projeto.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Profa. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia
Presidente do COEP/UFMG

ANEXO 4

Termo de consentimento livre e esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Nº Registro COEP: ETIC334/06 _____

Título do Projeto: Abordagem multidisciplinar do binômio depressão-demência no idoso

O senhor (a) está sendo convidado (a) a participar, como voluntário(a), em uma pesquisa de título: " Abordagem multidisciplinar do binômio depressão-demência no idoso"

O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que está sendo realizada. Sua colaboração neste estudo é muito importante, mas a decisão de participar deve ser sua. Para tanto, leia atentamente as informações abaixo e não se apresse em decidir. Se você não concordar em participar ou quiser desistir em qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você. Se você concordar em participar basta preencher os seus dados e assinar a declaração concordando com a pesquisa. Se você tiver alguma dúvida pode esclarecê-la com o responsável da pesquisa. Obrigado(a).

Objetivo do estudo

Este projeto está sendo proposto porque há pouco conhecimento sobre os mecanismos fisiológicos e genéticos envolvidos no processo do envelhecimento. O objetivo desse trabalho é o de estudar, em uma população brasileira, as interações clínicas, genéticas, ambientais e neurobiológicas como fatores de risco ou proteção no desenvolvimento de doenças neuropsiquiátricas do idoso.

A partir desta compreensão, esperamos, no futuro, desenvolver terapias que possam melhor atender aos pacientes idosos.

Procedimentos

Todos os(as) participantes pessoas com mais de 60 anos de idade, que assinarão termo de consentimento esclarecido serão considerados sujeito de pesquisa e irão seguir os procedimentos dessa pesquisa. Os únicos inconvenientes aos quais os pacientes serão submetidos serão a coleta de sangue total e o tempo gasto na avaliação do idoso. Esses procedimentos serão realização de testes psicológicos realizados por pessoas qualificadas. O desconforto da coleta de sangue é o habitual de um exame de sangue de rotina e é realizada com material estéril, descartável e por pessoas treinadas. O material colhido (máximo de 50 ml de sangue) será devidamente etiquetado e utilizado somente para os propósitos dessa pesquisa, não havendo quaisquer custos para a paciente. As informações obtidas serão objeto de estrita confidencialidade e não envolvem custos ou pagamentos de qualquer espécie.

Pesquisadores

A equipe de pesquisadores é composta pelos seguintes profissionais: Dr. Marco Aurélio Romano-Silva (coordenador da pesquisa), Dr. Edgar Nunes de Moraes, Dr. Humberto Correa, Dra. Maria Aparecida Bicalho, Dr. Luiz Armando De Marco

Confidencialidade

Todos os dados gerados nessa pesquisa serão mantidos em sigilo e apenas a equipe de pesquisadores terá acesso a eles. Os dados de cada participante receberão um código e não terão nenhuma identificação que permita associá-lo a um participante em particular. Caso o senhor/senhora queira poderá ter acesso aos resultados individuais.

Benefícios e riscos

Esta pesquisa não oferece qualquer risco ao participante, uma vez que consiste apenas de coleta de sangue total. Esta pesquisa é sem benefício individual direto, mas as informações obtidas nos auxiliarão a melhor compreender os mecanismos envolvidos no envelhecimento.

Não haverá qualquer tipo de despesa ao paciente, no que tange a materiais ou testes. Ao assinar esse termo de consentimento o senhor/senhora não está abrindo mão de seus direitos legais.

Desligamento

A sua participação neste estudo é voluntária e sua recusa em participar ou seu desligamento do estudo não envolverá penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Você poderá cessar sua participação a qualquer momento sem afetar seu acompanhamento médico em andamento.

Através deste documento fica assegurado o direito ao Sr(a) _____ que terá todos os esclarecimentos relativos à pesquisa, garantidos, incluindo os métodos utilizados. A partir do momento que o paciente participante da pesquisa não desejar mais fazer parte da pesquisa, reserve-lhe o direito de retirar o seu consentimento, livre de sofrer qualquer penalidade ou danos, quaisquer que sejam. Se no transcorrer da pesquisa tiver alguma dúvida, ou por qualquer outro motivo necessitar de orientações, poderá procurar um dos pesquisadores, Dr. Marco Aurélio Romano-Silva, no tel. 3409-9135 (UFMG), ou Dra. Maria Aparecida Camargos Bicalho, no telefone 3241-1848. Caso seja necessário, você pode entrar em contato com o COEP/UFMG, sito à Av. Antonio Carlos 6627, Unidade Administrativa II, 2º andar, Belo Horizonte – 31270-901, telefone 3499-4592, fax 3499-4027, e-mail coep@prpq.ufmg.br, onde maiores esclarecimentos poderão ser obtidos.

Eu, _____, paciente voluntário, dou consentimento livre e esclarecido, autorizo a retirada de 50 mL de sangue para que se façam os testes necessários a esta pesquisa e posterior uso e publicação dos dados nos relatórios finais e conclusivos, a fim de que estes sirvam para beneficiar a ciência e a humanidade. Declaro, ainda, que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

Belo Horizonte, ____ de _____ de 20____

Assinatura do participante

Assinatura do pesquisador:

Nome do pesquisador:

ANEXO 5
Protocolo de extração de DNA dos leucócitos pelo método da solução salina concentrada:

Soluções:

Solução de lise de células vermelhas (pH 7.4):

155 mM NH₄Cl – 8.3 g NH₄Cl
10 m KHCO₃ – 1.0 g KHCO₃
1 mM Na₂EDTA – 2 mL 0.5 M Na₂EDTA
Complete até 1 litro de água

Tampão de lise de núcleo (pH 8.2):

10 mM TRIS-HCl – 1 mL 2M Tris
400 mM NaCl – 16 mL 5M NaCl
1 mM Na₂EDTA – 0.8 mL 0.5M Na₂EDTA
Complete tudo para 200mL e autoclave

Solução de Proteinase K:

0.1 g de Proteinase K (200U/mg)
5 mg 10% SDS
2 mL 500mM de EDTA
43 mL de H₂O

Tampão de TE (pH 7.5)

10 mM Tris-HCl
1 mM Na₂EDTA
Autoclave o tampão

NaCl saturado

Adicione NaCl à água até que o sal não possa mais dissolver na solução (aproximadamente 6M). Autoclave.

Amostras de sangue são melhor processadas nos primeiros três dias após a venopunção.

Dia 1:

Transfira a amostra de sangue para um tubo de 50 mL contendo 30 mL de solução para glóbulos vermelhos. Seale o tubo com parafilme para prevenir o vazamento e coloque o tubo no gelo por 10-15 minutos até que o sangue comece a ficar escuro.

Centrifugue a 800 x g por 10 minutos. Despeje o sobrenadante num frasco com pequeno volume de água sanitária, sendo cuidadoso para não desprezar ou mover o pellet de células brancas. Cuidado extra deve ser tomado com amostras de sangue mais velhas que três dias; quando decantar o sobrenadante de células vermelhas, o pellet branco pode não ser distinguível. Neste caso, é sendo melhor deixar os últimos 4-5 ml de solução no tubo.

Ressuspenda o pellet de células brancas em 30 ml de solução de glóbulos vermelhos e centrifugue a 800 x g por 10 minutos. Remova o sobrenadante. Depois de lavar, o pellet branco vai ser aparente. Repita a etapa de lavagem novamente.

Ressuspenda o pellet de células brancas em 3 mL de tampão de lise de núcleo.

Adicione 200 µL de SDS a 10% e 500 µL de solução de proteinase K. Incube o lisado de células a 37°C durante a noite permitindo que a proteína cinase degrade as proteínas. Caso o pellet continue invisível, adicione de novo 500 µL de solução de proteinase K e incube a 37°C. Essa etapa vai ser necessária para sangues com mais de três dias de retirada.

Dia 2

Depois da digestão, adicione 3 mL de H₂O e 3 mL de NaCl saturado. Misture bem. Centrifugue a 1200 x g por 30 minutos para precipitar proteínas. Cuidadosamente transfira o sobrenadante para um tubo de 50 mL, evitando que o pellet de proteína flutue. No sobrenadante, adicione 2 volumes de álcool na temperatura ambiente e inverta o tubo até que o DNA seja visível. Transfira o DNA para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e lave com etanol 70%. Ressuspenda em 1 mL de tampão TE. Deixe *overnight* em “banho Maria” a 35° Celsius para ressuspender e estoque a 4°C.