

Universidade Federal de Minas Gerais

Patrícia de Araújo Pereira

**Associação entre polimorfismos dos genes
AKT1, *AKTIP*, *OX2R*, *PER2*, *PER3* e *CLOCK* em idosos
com Depressão de Início Tardio ou Doença de Alzheimer**

Orientadora: Profa. Dra. Débora Marques de Miranda

Coorientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Romano-Silva

Belo Horizonte
2014

Universidade Federal de Minas Gerais

Patrícia de Araújo Pereira

**Associação entre polimorfismos dos genes
AKT1, *AKTIP*, *OX2R*, *PER2*, *PER3* e *CLOCK* em idosos
com Depressão de Início Tardio ou Doença de Alzheimer**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Medicina
Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito
para obtenção do grau Doutor (Ph.D.) em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Débora Marques de Miranda

Coorientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Romano-Silva

Belo Horizonte
2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR



ATA DA DEFESA DE TESE DA ALUNA PATRÍCIA DE ARAÚJO PEREIRA

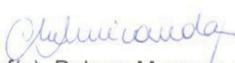
Realizou-se, no dia 31 de março de 2014, às 14:00 horas, Faculdade de Medicina, sala 029 - térreo, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada *Associação entre polimorfismos dos genes AKT1, AKTIP, OX2R, PER2, PER3 e CLOCK em Pacientes diagnosticados com Depressão de Início Tardio ou Doença de Alzheimer: estudo caso-controle*, apresentada por PATRÍCIA DE ARAÚJO PEREIRA, número de registro 2010717133, graduada no curso de CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em MEDICINA MOLECULAR, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Debora Marques de Miranda - Orientadora (UFMG), Prof. Marco Aurelio Romano Silva (UFMG), Prof(a). Maria Aparecida Camargos Bicalho (UFMG), Prof. Célio José Castro Junior (SCMBH), Prof(a). Luciana Bastos Rodrigues (UFJF), Prof. Rodrigo Nicolato (UFMG).

A Comissão considerou a tese:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.
Belo Horizonte, 31 de março de 2014.

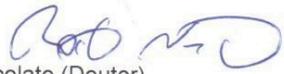

Prof(a). Debora Marques de Miranda (Doutora)


Prof. Marco Aurelio Romano Silva (Doutor)


Prof(a). Maria Aparecida Camargos Bicalho (Doutora)


Prof. Célio José Castro Junior (Doutor)


Prof(a). Luciana Bastos Rodrigues (Doutora)


Prof. Rodrigo Nicolato (Doutor)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR



FOLHA DE APROVAÇÃO

Associação entre polimorfismos dos genes AKT1, AKTIP, OX2R, PER2, PER3 e CLOCK em Pacientes diagnosticados com Depressão de Início Tardio ou Doença de Alzheimer: estudo caso-controle

PATRÍCIA DE ARAÚJO PEREIRA

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MEDICINA MOLECULAR, como requisito para obtenção do grau de Doutora em MEDICINA MOLECULAR, área de concentração MEDICINA MOLECULAR.

Aprovada em 31 de março de 2014, pela banca constituída pelos membros:

Prof(a). Debora Marques de Miranda - Orientador
UFMG

Prof. Marco Aurelio Romano Silva
UFMG

Prof(a). Maria Aparecida Camargos Bicalho
UFMG

Prof. Celso José Castro Junior
SCMBH

Prof(a). Luciana Bastos Rodrigues
UFJF

Prof. Rodrigo Nicolato
UFMG

Belo Horizonte, 31 de março de 2014.

SUMÁRIO

Sumário.....	iii
Agradecimentos.....	v
Lista de figuras.....	vii
Lista de tabelas e quadros.....	viii
Abreviaturas.....	ix
Resumo.....	xii
Resumo em inglês (Abstract).....	xiii
1. Introdução	
1.1 Depressão/Demência.....	2
1.2 Doença de Alzheimer.....	6
1.3 Hiperfosforilação da Proteína Tau.....	8
1.4 Processo Amiloidogênico.....	11
1.5 Ciclo circadiano e DIT/DA.....	13
2. Justificativa.....	20
3. Objetivos.....	22
4. Artigos	
4.1.....	25
4.2.....	26
5. Materiais e Métodos	
5.1 Diagnóstico e Escolha dos indivíduos.....	28

5.2 Genotipagem.....	32
5.3 Análise Estatística.....	34
6. Resultados.....	36
7. Discussão.....	55
8. Limitações.....	63
9. Conclusão.....	65
10. Referências Bibliográficas.....	66

AGRADECIMENTOS

A Deus,

Aos meus pais, Marlene e HÉlbio, pelo apoio, amor e educação.

À minha Orientadora e mãe científica, Débora Marques de Miranda, pela dedicação, carinho e disponibilidade. Tenho certeza de que muitas “Patrícias” passarão sob sua orientação, mas não sei se terei o privilégio de outra Débora em minha vida profissional. Muito Obrigada.

Ao Professor Dr. Marco Aurélio Romano Silva pela oportunidade, receptividade e por ter propiciado condições para realização deste trabalho.

Aos meus escolhidos irmãos de coração Vítico, Tónim, Meu Rei, Sica, Jess e Karenzinha.

Aos meus amigos e amigas do “Lab” que estiveram ao meu lado Manuel, Dani-Dani, Sr. Cornélio, Luiza, Soraia, Alexandre Barros, Elizete, Nancy, Erika.

Ao Professor Dr. Luiz Armando De Marco pelo apoio.

À Tia Marisa e Tia Marilda (*in memoriam*) pelo incentivo.

À Cidinha, pelo incentivo e colaboração desde o início.

Minha IC, Isadora Bozzi;

Às amigas da Califórnia, Andressa Bolsoni Lopes e Elayne Vieira Dias,

Ao Marcos (Mô) e família que tanto amo,

À Juju (princesinha),

Aos Colegas do Centro de Referência do Idoso.

Aos meus colegas de laboratório.

Aos amigos de fora do mundo científico, em especial Manu, Lilian e Ju.

A todos os idosos sadios ou doentes que colaboraram com este estudo e que tiveram fundamental importância.

Aos perfeitos, digo, inenarráveis momentos na salinha do café do Síndico Schütze.

À banca examinadora.

Obrigada.

Este trabalho foi realizado com o auxílio das seguintes instituições:

- Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) de Medicina Molecular
- CAPES
- Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formação Emaranhados Neurofibrilares.....	8
Figura 2. Processo Amiloidogênico	11
Figura 3. Sistema Orexinérgico	14
Figura 4. Clivagem da pré-proorexina	15
Figura 5. Interação proteica entre Per e CLOCK.....	18
Figura 6. Gráfico PCR em tempo real	34
Figura 7. Gráfico da qualidade do sono na amostra.....	39
Figura 8. LD <i>AKT1</i> e <i>AKTIP</i> dos DIT.....	47
Figura 9. LD OX2R e DIT.....	51
Figura 10. MDR – DIT.....	52
Figura 11. MDR – DA.....	53

LISTA DE TABELAS e QUADROS

Tabela 1. Questionário GDS.....	31
Tabela 2. Descrição dos marcadores dos genes.....	32
Tabela 3. Dados Sócio-Demográficos.....	37
Tabela 4. Dados Clínicos.....	38
Tabela 5. Frequência alélica e genotípica do <i>AKT1</i> em DAs.....	40
Tabela 6. Frequência alélica e genotípica do <i>AKTIP</i> em DAs.....	41
Tabela 7. Frequência alélica e genotípica dos <i>PER3</i> , <i>PER2</i> e <i>CLOCK</i> em DAs.....	42
Tabela 8. Frequência alélica e genotípica do <i>OX2R</i> em DAs.....	43
Tabela 9. Frequência alélica e genotípica do <i>AKT1</i> em DIT.....	45
Tabela 10. Frequência alélica e genotípica do <i>AKTIP</i> , <i>PER3</i> , <i>PER2</i> e <i>CLOCK</i> em DIT.....	48
Tabela 11. Frequência alélica e genotípica do <i>OX2R</i> em DTI.....	50
Tabela 12. Análise de interação pelo MDR.....	54
Quadro 1. Teste Cognitivo.....	28
Quadro 2. Inventário Neuropsiquiátrico.....	30

ABREVIATURAS

A β – beta amiloide

AKT1, V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1 (gene)

Akt1 – Referente à proteína codificada pelo gene *AKT1*

AKTIP, AKT-interacting protein (gene)

APP - amyloid precursor protein

AVD`s - Atividades de Vida Diárias

CLOCK - Circadian Locomotor Output Cycles Kaput (gene)

DA – Doença de Alzheimer

DIT – Depressão de início tardio

DNA – para o português ADN, ácido desoxirribonucleico

DSM-IV – Manual de diagnóstico e estatística de transtornos mentais da Associação Americana de Psiquiatria – Quarta Edição (American Psychiatric Association Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders - Fourth Edition)

FAM – 6-carboxifluoresceína

HEX – hexacloro-6-carboxifluoresceína

IC - intervalo de confiança

ISRS – inibidor seletivo de recaptção de serotonina

MEEM - Mini Exame do Estado Mental

OR – Odds Ratio

OX2R – receptor de orexina 2 (gene)

Ox2r – Referente ao receptor codificado pelo gene *OX2R*

PCR - reação em cadeia da polimerase

PER2, PER3 - Period homolog 2 e 3 (gene)

RNA – para o português ARN ácido ribonucleico

rs – número de referência do SNP

SNC – sistema nervoso central

SNP - polimorfismo de único nucleotídeo

Tag SNP - *tagging*SNP representativo de uma região do genoma com elevado *linkage disequilibrium*. É possível identificar variações genéticas e uma região cromossômica sem genotipar qualquer SNP. Podem ser usados como representantes dos outros SNPs daquela região. É útil em estudos de “whole genome”, nos quais milhares de SNPs Tag SNPs são genotipados ao longo de todo o genoma. Utilizado para descobrir genes responsáveis pelas doenças.

RESUMO

A depressão é uma das doenças de maior prevalências na população, atingindo cerca de 20% dos indivíduos ao longo da vida. Quando o primeiro episódio atinge indivíduos com mais de 65 anos é considerada depressão de início tardio (DIT). A população idosa aumentou significativamente no Brasil e estima-se que alcance em 2025 cerca de 32 milhões de indivíduos. A doença de Alzheimer (DA) e a depressão são doenças altamente prevalentes na população idosa e determinam elevada taxa de incapacidade. Estudos prévios sugerem que a depressão, principalmente a de início tardio, possa representar um fator de risco para DA ou, até mesmo, uma manifestação precoce da doença. Tem sido sugerido uma associação entre os genes circadianos na patologia da DIT e DA devido as alterações do ciclo sono-vigília. Realizamos um estudo envolvendo os seguintes indivíduos: grupo controle (112), DA (249), DIT (222), 19 SNPs sendo 7 de *AKT1*, 2 de *AKTIP*, 2 de *PER3*, 1 de *PER2*, 1 de *CLOCK* e 6 de *OX2R*. Os participantes foram avaliados de acordo com os critérios do DSM-IV, MINI-PLUS e Escala de Depressão Geriátrica (GDS) para os DIT e NINCDS-ADRDA para DA. Nossos resultados sugerem uma associação entre o homozigotos T/T do rs3730358 e DIT. Na análise de alelos, os tagSNPs rs7741664 e rs2134294 do *OX2R* demonstraram associação com o alelo C e DIT em relação ao grupo controle. O rs2134294 mostrou também uma associação C/C e DIT em comparação com o grupo controle, com *odd's ratio* de 2,1. Para os outros marcadores estudados nenhuma associação foi encontrada. Este estudo é o primeiro a estabelecer a associação dos genes *AKT1* e *OX2R* na DIT.

ABSTRACT

Depression is a disease with the highest prevalence in the population, affecting about 20% of individuals throughout life. When the first episode affects individuals older than 65 years is considered late-onset depression (LOD). The elderly population has increased significantly in Brazil and is estimated to reach, by 2025, about 32 million individuals. Alzheimer's Disease (AD) and depression are highly prevalent diseases in the elderly population and determine high rates of disabilities. Previous studies suggest that depression, especially LOD, may represent a risk factor for AD or an early manifestation of the disease. It has been suggested an association between circadian genes in the pathology of LOD and AD due to sleep-wake alterations. We conducted a study involving individuals: control group (112), DA (249), LOD (222), with 19 SNPs (7 *AKT1*, 2 *AKTIP*, 2 *PER3*, 1 *PER2*, 1 *CLOCK* and 6 *OX2R*). Participants were assessed according to DSM-IV, MINI-PLUS and Geriatric Depression Scale (GDS) for LOD and NINCDS-ADRDA criteria for AD. Our results suggest an association between rs3730358 homozygous T/T and LOD. In the alleles analysis, the tagSNPs rs7741664 and rs2134294, both *OX2R*, showed allele C association with LOD. The rs2134294 C/C genotype also showed LOD association, with *odds ratio* of 2.1. For other markers studied no association was found. This study is the first to establish the association of *AKT1* and *OX2R* genes in LOD.