

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

MARIA LUISA SORIANI

**CARACTERIZAÇÃO DO POLIMORFISMO -308 G>A
(rs1800629) DO FATOR DE NECROSE TUMORAL
(TNF) NO ENVELHECIMENTO E NA DOENÇA DE
ALZHEIMER**

BAURU
2015

MARIA LUISA SORIANI

**CARACTERIZAÇÃO DO POLIMORFISMO -308 G>A
(rs1800629) DO FATOR DE NECROSE TUMORAL
(TNF) NO ENVELHECIMENTO E NA DOENÇA DE
ALZHEIMER**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Sagrado Coração, como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Biomedicina, sob orientação do Prof. Dr. Spencer Luiz Marques Payão.

BAURU
2015

Soriani, Maria Luisa

S7141c

Caracterização do polimorfismo -308 G>A (rs 1800629) do fator de necrose tumoral (TNF) no envelhecimento e na doença de Alzheimer / Maria Luisa Soriani. -- 2015.

28f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Spencer Luiz Marques Payão.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade do Sagrado Coração – Bauru – SP.

1. Doença de Alzheimer. 2. TNF. 3. PCR-RFLP. I. Payão, Spencer Luiz Marques. II. Título.

MARIA LUISA SORIANI

**CARACTERIZAÇÃO DO POLIMORFISMO -308 G>A (rs 1800629) DO
FATOR DE NECROSE TUMORAL (TNF) NO ENVELHECIMENTO E
NA DOENÇA DE ALZHEIMER**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Sagrado Coração, como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Biomedicina, sob orientação do Prof. Dr. Spencer Luiz Marques Payão.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Spencer Luiz Marques Payão
Universidade do Sagrado Coração

Prof. Dr. Lucas Trevisani Rasmussen
Universidade do Sagrado Coração

Bauru, 01 de dezembro de 2015.

Dedico este trabalho aos meus amados pais Luis e Cleide, às minhas irmãs Weruska e Thaís e ao meu querido irmão Fábio. Dedico também ao Guilherme. Sem vocês eu não teria conseguido.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pois eu não seria nada sem vocês. Não existem palavras suficientes no mundo para expressar o quanto sou grata a vocês.

Às minhas amadas irmãs que sempre estiveram, estão e vão estar lá por mim. Sempre serei a “Baby” de vocês.

Ao meu irmão, meu anjo da guarda, que infelizmente já não está mais aqui, mas sei que acompanha cada passo que dou. Sinto sua falta.

Ao Guilherme, que me ajudou e me apoiou em todos os momentos. Você sempre será muito especial.

Ao meu cunhado Junior: agora sou uma “malinha” biomédica!

Às amigas Lívia Pagani, Beatriz Cestari, Thais Caroline, Lívia De Luca, Thaisa Rosa e Marcella Furtado, obrigada pela amizade e apoio incondicional. Vocês fizeram tudo ficar melhor.

Agradeço ao Prof. Dr. Spencer Payão pela oportunidade e orientação durante todo o trajeto, desde a iniciação científica até a elaboração deste projeto.

Ao Prof. Dr. Lucas Rasmussen que sempre me ajudou e orientou.

Ao Wilson Orcini, que sempre me ajudou a encontrar as origens das contaminações das PCRs, e claro, pelo companheirismo.

A todos os professores fantásticos que tive a oportunidade de ser aluna.

À Universidade do Sagrado Coração, foram 5 ótimos anos, obrigada!

À Faculdade de Medicina de Marília (FAMEMA) por ter coletado e cedido as amostras utilizadas neste projeto.

Ao CNPq por ter me concedido a bolsa de iniciação científica e a Fapesp (Auxílio à Pesquisa 09/15857-9), sem os quais não seria possível realizar o projeto.

"Palavras são, na minha nada humilde opinião, nossa inesgotável fonte de magia. Capazes de causar grandes sofrimentos e também remediá-los."

Alvo Dumbledore
(ROWLING, J. K, 2011)

RESUMO

A Doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa progressiva e irreversível, com uma média de 37 milhões de pessoas acometidas no mundo. Como todas as outras doenças neurodegenerativas, a DA também se caracteriza pelo comprometimento progressivo das células neurais. Outra característica analisada na DA é a presença de uma neuroinflamação crônica, e é nesse cenário que o Fator de Necrose Tumoral (TNF) surge como alvo de estudo para novos mecanismos de tratamento e terapia contra a DA. Dentre os polimorfismos do gene TNF, será destacado o -308 G>A rs1800629. O presente estudo teve como objetivo avaliar as frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo -308 G>A do gene TNF e comparar as mesmas no grupo de pacientes com a doença de Alzheimer, idosos saudáveis e jovens saudáveis. Foram utilizados 244 indivíduos, sendo 81 pacientes com DA, 80 idosos saudáveis e 83 jovens saudáveis. O DNA foi extraído a partir de sangue periférico utilizando o QIAamp DNA BloodMidi Kit® - 51185 (QIAGEN). Para determinar o polimorfismo foi usada a técnica de PCR e tratamento enzimático com *Nco*I, seguido pela eletroforese em gel de agarose 2,5% para detecção dos fragmentos. Foi observada uma diferença estatisticamente significativa na distribuição dos genótipos entre os grupos. O genótipo GG foi predominante em todos os grupos, entretanto os genótipos GA e AA apresentaram uma maior variação.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer. TNF. PCR-RFLP.

ABSTRACT

Alzheimer's Disease (AD) is an irreversible and progressive neurodegenerative disease that affects an average of 37 million people around the world. Like all the neurodegenerative diseases, AD is also characterized by the progressive commitment of the neuronal cells. Another aspect analyzed on AD is the presence of a chronic neuroinflammation, and it is in this scene that the Tumor Necrosis Factor (TNF) appears as the target of studies for new mechanisms of treatment and therapy against AD. Between all the TNF gene polymorphisms, the -308 G>A rs1800629 will be the one highlighted. This study had the aim to evaluate the allelic and genotypic frequencies of the -308 G>A TNF gene polymorphism and compare it among the Alzheimer's disease group, healthy elderly group and healthy young group. In total, there was 244 subjects, which 81 were AD patients, 80 were healthy elderly patients and 83 were healthy young. The DNA was extracted from peripheral blood through the QIAamp DNA Blood Midi Kit® - 51185 (QIAGEN). To determine the polymorphism the PCR technique was used and an enzymatic treatment with *Nco*I, followed by the electrophoresis in 2,5% agarose gel for the fragments detection. It was observed a statistically significant difference between the groups genotypes. The GG genotype was the prevailing one in all groups; however, the GA and AA genotypes had a higher variation.

Keywords: Alzheimer's Disease. TNF. PCR-RFLP.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio para visualização do produto da PCR de 107pb referente ao gene TNF- α . Slot 1 – Marcador de peso molecular 100pb.....21
- Figura 2:** Gel de agarose 3%, corado com brometo de etídio para caracterização dos alelos do TNF- α , utilizando a enzima NcoI. Slots 2 e 8: Genótipo GA; Slots 3 - 7: Homozimogo, Genótipo GG; Slot 1: Marcador de peso molecular 100pb.....21
- Figura 3.** Distribuição dos genótipos de acordo com o sexo masculino em cada grupo.....22
- Figura 4.** Distribuição dos genótipos de acordo com o sexo feminino em cada grupo.....22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição dos alelos do Fator de Necrose Tumoral do polimorfismo -308 G>A.....	20
Tabela 2: Distribuição dos genótipos do Fator de Necrose Tumoral, polimorfismo -308 G>A.....	20
Tabela 3: Porcentagem de cada genótipo nos grupos estudados.....	23

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 CARACTERIZAÇÕES DA DOENÇA DE ALZHEIMER.....	12
1.2 ASPECTOS GENÉTICOS DA DOENÇA DE ALZHEIMER.....	13
1.3 POLIMORFISMO G>A DO FATOR DE NECROSE TUMORAL (TNF- α).....	14
2 OBJETIVOS	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 SELEÇÃO DOS INDIVÍDUOS.....	17
3.2 MÉTODOS.....	17
4 RESULTADOS	20
4.1 DOENÇA DE ALZHEIMER.....	23
4.2 CONTROLE IDOSO.....	23
4.3 CONTROLE JOVEM.....	23
5 DISCUSSÃO	24
6 CONCLUSÕES	25
REFERÊNCIAS	26
ANEXOS	29

1 INTRODUÇÃO

1.1 CARACTERIZAÇÕES DA DOENÇA DE ALZHEIMER

A doença de Alzheimer (DA) foi originalmente descrita como Dementia Praecox em 1907, pelo neuropatologista alemão Alois Alzheimer (MU e GAGE, 2011) e é caracterizada pela perda de memória progressiva e déficit de função cognitiva. Atualmente a doença de Alzheimer é a doença neurodegenerativa mais comum no mundo (SUKHORUKOV e MEYER-HERMANN, 2015) e há previsões de que sua incidência há de aumentar conforme a expectativa de vida da população mundial cresça (HAN, JY e HAN SH, 2014). A causa exata da DA ainda é desconhecida, entretanto, sabe-se que é uma doença multifatorial relacionada ao envelhecimento (HAN, JY e HAN SH, 2014).

Por causa dos sintomas não específicos que caracterizam a doença, seu diagnóstico geralmente é quase sempre tardio (SUKHORUKOV e MEYER-HERMANN, 2015). Atualmente, o diagnóstico da DA é baseado em exames clínicos, testes neurofisiológicos e exames de imagem do cérebro, os quais, muitas vezes não são concludentes (MAYNARD et al., 2015). Para a realização de um diagnóstico mais confiável, utilizam-se exames de imagem e pesquisa de biomarcadores específicos, tais como A β 1-42, proteína tau fosforilada 181 e proteína tau total no líquido cefalorraquidiano (MAYNARD et al., 2015; HARRIS et al., 2015). Não há nenhum teste para diagnóstico definitivo da DA baseado em fluidos periféricos. Testes assim ajudariam, e muito, na prevenção e tratamento da doença. O diagnóstico definitivo da doença de Alzheimer só pode ser feito post-mortem (MAYNARD et al., 2015).

Tentativas farmacológicas para curar, interromper ou modificar a doença têm sido, de modo geral, infrutíferas (HAN, JY e HAN SH, 2014). Apesar das várias pesquisas, não há atualmente nenhuma cura disponível, apenas terapias que visam diminuir a progressão das lesões neuronais, as quais são mais efetivas nos estágios iniciais da doença (SUKHORUKOV e MEYER-HERMANN, 2015).

A doença de Alzheimer afeta mais de 37 milhões de pessoas no mundo todo e seu fardo econômico é imenso. De acordo com o World Alzheimer Report de 2013, o custo mundial da doença atualmente é de mais de U\$600 bilhões de dólares ou aproximadamente 1% do PIB global (HU et al., 2014).

A prevalência da demência em diversas regiões do mundo é de 1,17% na população entre 65 e 69 anos e mais de 50% na população acima de 95 anos. Um estudo brasileiro identificou uma prevalência de 7,1% para qualquer tipo de demência na população idosa, e 54% dos casos eram da doença de Alzheimer. Uma revisão da literatura brasileira mostra uma prevalência de demência que varia de 5,1% a 19% em São Paulo, o que pode indicar que São Paulo tem números próximos a países desenvolvidos do que as outras regiões do Brasil (ALMEIDA et al., 2014)

1.2 ASPECTOS GENÉTICOS DA DOENÇA DE ALZHEIMER

A doença de Alzheimer é uma doença degenerativa progressiva multifatorial com alterações patológicas no cérebro. É a principal forma de demência no mundo e é definida pelo comprometimento gradual da memória, funções cognitivas, e comportamentais durante o envelhecimento (SUBASH et al., 2014).

A neuropatologia da DA é caracterizada pela rápida perda de sinapses, degeneração de neurônios e distúrbios no raciocínio, planejamento, percepção e pensamentos racionais (SENIYA et al., 2010). Também é característico da doença a deposição no cérebro de placas senis compostas de proteína β amiloide e emaranhados neurofibrilares, os quais contêm proteína Tau hiperfosforilada (SUBASH et al., 2014).

A proteína β amiloide é gerada em consequência de clivagens sequenciais de proteína precursora amiloide (APP) pelas enzimas β e γ -secretase. Sua produção anormal e acúmulo de proteína no parênquima cerebral resultam na DA (HAN e JUNG-MOOK, 2014). Juntamente com a proteína β amiloide, a proteína Tau (emaranhados neurofibrilares) é outro fator determinante na patogênese da DA. A proteína Tau desempenha um papel essencial, não apenas como proteína axonal, mas também como regulador da função dendrítica (HAN e JUNG-MOOK, 2014)., ela estabiliza os microtúbulos (compõe o citoesqueleto) (SUKHORUKOV e MEYER-HERMANN, 2015) e seu processo de associação em condições normais. Durante a patogenia da DA, Tau se torna hiperfosforilada, agregada e se acumula na forma dos emaranhados neurofibrilares (HAN e JUNG-MOOK, 2014).

A relação entre os depósitos de placas senis/emaranhados neurofibrilares e a degeneração neuronal ainda não estão claros. Entretanto, a maior parte dos casos

de doença de Alzheimer ocorre esporadicamente, resultante da influência de vários fatores ambientais não genéticos. O mecanismo implícito na doença de Alzheimer aparenta ser diversificado, assim como os potenciais métodos terapêuticos para o tratamento da mesma (SUBASH et al., 2014).

1.3 POLIMORFISMO -308 G>A DO FATOR DE NECROSE TUMORAL (TNF)

O Fator de Necrose Tumoral é uma citocina pró-inflamatória multifuncional produzida principalmente por macrófagos, e é o principal mediador da resposta inflamatória aguda a microrganismos e é responsável por complicações sistêmicas. A família do TNF consiste de 19 membros, os quais mediam diversas funções biológicas em uma variedade de sistemas (CHENG et al., 2015). A principal função do TNF é estimular o recrutamento de neutrófilos e monócitos para os sítios de infecção a ativar essas células para erradicar os microrganismos. O TNF induz as células endoteliais vasculares a expressarem moléculas de adesão que se tornam um adesivo da superfície endotelial para leucócitos no local de infecção (COUTINHO et al., 2014). TNF é um potente mediador inflamatório, o qual é produzido por monócitos, macrófagos, células T CD4 e CD8, células natural killers, células endoteliais, uma variedade de células não hematopoiéticas e também outras células, como os mastócitos e os neutrófilos quando estimulados (BAZZAZ et al., 2014).

O Fator de Necrose Tumoral possui uma vasta gama de atividades biológicas, incluindo a indução da regressão tumoral, febre, caquexia, choque, e resposta imune celular (TOLIDE-IE et al., 2014). O TNF tem função de regular os processos biológicos, como a proliferação e diferenciação celular, apoptose, metabolismo de lipídios, e coagulação sanguínea (COUTINHO et al., 2014).

A expressão geral dos receptores do TNF através de uma grande variedade de células e tecidos sugerem que o Fator de Necrose Tumoral está envolvido em várias atividades biológicas. Além do seu papel no processo pró-inflamatório, o TNF possui outras funções como a promoção da proliferação de células T in vitro, prevenir a deleção de células T induzidas por super antígenos, além de influenciar criticamente a formação de centros germinativos após a imunização. Em circunstâncias patológicas, todas essas propriedades, as quais contribuem para o estabelecimento, manutenção, ou acentuação das respostas imunes específicas, podem culminar em uma lesão tecidual grave (BAZZAZ et al., 2014).

O gene humano do TNF se localiza no braço curto do cromossomo 6. O polimorfismo -308 G>A na região promotora do gene aumenta a ativação da transcrição do mesmo (RENZO et al., 2013). Existem três possíveis genótipos, sendo eles o genótipos homozigotos GG e AA, ou o genótipo heterozigoto GA. O polimorfismo -308 do TNF (rs1800629) consiste na substituição da base nitrogenada guanina (G) pela base adenina (A) na posição -308 na região promotora do gene do TNF (CORCHADO et al., 2013). Um polimorfismo de um único nucleotídeo na posição (-308) no promotor do gene do TNF, definido como TNF1 (-308 G) e TNF2 (-308 A), foi identificado, no qual o alelo menos comum TNF2 está associado com uma maior produção de TNF (TOLIDE-IE et al., 2014).

Uma grande quantidade de TNF foi encontrado em volta das placas senis em cérebros de pacientes com Alzheimer. Essa elevação anormal do nível de TNF sugeriu uma associação com o risco de se ter DA (MU e GAGE, 2011).

2 OBJETIVOS

Considerando amostras de DNA de sangue de pacientes com doença de Alzheimer, idosos saudáveis e jovens saudáveis, o estudo teve como objetivos:

- a) Avaliar as frequências alélicas e genóticas do polimorfismo (rs1800629) do gene do TNF, por meio da técnica de PCR – RFLP.
- b) Comparar as frequências do referido genótipo nos três grupos estudados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Aproximadamente 4 mL de sangue total periférico foram obtidos através de punção venosa com seringa e agulha estéril, em tubos contendo anticoagulante (EDTA), e utilizados para extração de DNA genômico.

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Marília (FAMEMA), parecer 812.645 (Em anexo).

3.1 SELEÇÃO DOS INDIVÍDUOS

3.1.1 Pacientes com doença de Alzheimer

O material deste estudo foi obtido de 81 pacientes com doença de Alzheimer, de ambos os sexos. Foram estudados no presente projeto, somente pacientes que apresentaram um mínimo de três anos de evolução da doença de Alzheimer e caracterizados pelos CDRs (coeficiente de demência) (MORRIS, 1993). O grupo de pacientes com Doença de Alzheimer foi composto por 81 pacientes de ambos os sexos, sendo que 30% eram homens e 70% mulheres. A idade média é de 74 ± 7 .

Todos os pacientes com doença de Alzheimer foram selecionados no Ambulatório de Neurologia do Comportamento da UNIFESP/EPM, sob supervisão do Prof. Dr. Paulo Bertolucci.

O critério diagnóstico utilizado para a caracterização da DA é o NINCDS-ADRDA (National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's disease and Related Disorders Association) (MCKHANN et al., 1984; FELDMAN et al., 2008) critério foi estabelecido com base no DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders), com adaptações para o diagnóstico provável da doença de Alzheimer.

3.1.2 Grupos controles

Os indivíduos que pertenceram ao segmento de controle foram divididos em dois grupos baseado em suas idades. Os controles idosos foram selecionados no Ambulatório de Geriatria da FAMEMA e os jovens sadios (as) são estudantes dos cursos de Medicina e Enfermagem da mesma.

O grupo de controle idoso foi composto por 80 idosos (as) sadios (as) com idades aproximadas à dos pacientes com DA, sem sequela de Acidente Vascular Cerebral, sem depressão profunda e não alcoolista, foram avaliados pelo Mini Exame do Estado Mental e pela aplicação do Índice de Katz. O grupo Controle Idoso foi formado por 80 pacientes, também de ambos os sexos, sendo que 33% são homens e 67% mulheres. A idade média do grupo é de 70 ± 8 .

O grupo de Controle Jovem foi constituído por 83 pacientes de ambos os sexos, sendo que 45% são homens e 55% mulheres. As idades do grupo variam entre 18 e 25 anos, sendo que a média de idade é de $20 \pm 1,6$.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Extração de DNA

Para extração de DNA de sangue total periférico obtido por meio de punção venosa, foi utilizado o kit QIAamp DNA BloodMidi Kit® - 51185 (QIAGEN), segundo instruções do fabricante.

A extração do DNA ocorre basicamente em três fases, utilizando uma coluna feita de sílica apropriada para ligação do DNA. A primeira etapa consiste na lise das células e em seguida adsorção das mesmas na coluna. Em seguida são realizadas lavagens, com soluções descontaminantes, e eluição do DNA em 200 µl de tampão AE (10 mM Tris·Cl; 0.5 mM EDTA, pH 9.0) ou água.

3.2.2 Análise dos polimorfismos do gene do *TNF* (-308 G>A)

Para determinação do polimorfismo na região -308 G>A (rs1800629) (a partir do sítio de início da transcrição) foi realizada a técnica da PCR, que amplificou um fragmento de 107pb, seguida do tratamento enzimático (RFLP – Restriction Fragment Length Polimorphism), de acordo com as condições descritas[18], que consistiu no tratamento do produto de PCR com a enzima de restrição *Nco*I. Após o tratamento, esses produtos foram fracionados em um gel de agarose a 2,5%, corado com brometo de etídio, visualizado em um transiluminador ultravioleta, fotografado e analisado quanto à distribuição dos alelos, por meio do sistema de captura de imagens Alpha Imager 2200 (Alpha Innotech Corporation). A descrição dos “primers”, assim como as condições de amplificação estão descritas a seguir.

“Primers”

TNF1 - AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT

TNF2 - TCCTCCCTGCTCCGATTCCG

Condições de amplificação:

35 ciclos de: 45 seg a 94°C, 45 seg a 61°C e 45 seg a 72°C

Produtos esperados: Genótipo AA: fragmento de 107pb, Genótipo GA: fragmentos de 107, 87 e 20pb, Genótipo GG: fragmentos de 87 e 20pb.

4 RESULTADOS

No estudo inicial foi proposto analisar as frequências alélicas e genóticas do polimorfismo da base -308 (G>A) (rs1800629) do TNF, assim como comparar a frequência do genótipo em cada grupo, sendo eles Doença de Alzheimer, Controle Idoso e Controle Jovem, e cujos resultados obtidos são apresentados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1- Distribuição dos alelos do Fator de Necrose Tumoral do polimorfismo -308 G>A

ALELOS	DA	CI	CJ
G	88,3%	87,25%	89,15%
A	11,7%	18,75%	10,85%
Total	100%	100%	100%

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Amostras de sangue periférico de pacientes com doença de Alzheimer (DA), idosos saudáveis (CI) e jovens saudáveis (CJ).

Tabela 2- Distribuição dos genótipos do Fator de Necrose Tumoral do polimorfismo (-308)

GENÓTIPOS	DA	CI	CJ
G/A	48,5%	10%	14,46%
G/G	79%	76,25%	81,93%
A/A	2,5%	13,75%	3,61%
Total	100%	100%	100%

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Amostras de sangue periférico de pacientes com doença de Alzheimer (DA), idosos saudáveis (CI) e jovens saudáveis (CJ).

Pode-se observar a eletroforese contendo os produtos da PCR na Figura 1, enquanto que na Figura 2 observa-se a digestão enzimática por RFLP.

Figura 1-Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio evidenciando o produto da PCR de 107pb referente ao gene *TNF.Slot1*: Marcador de peso molecular 100pb.

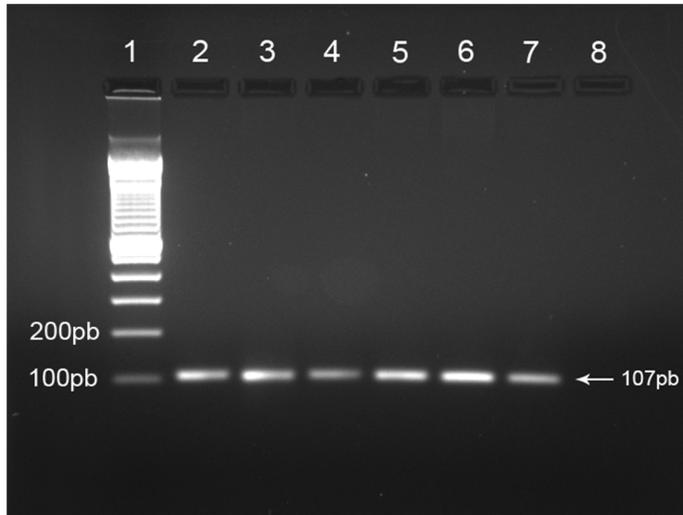
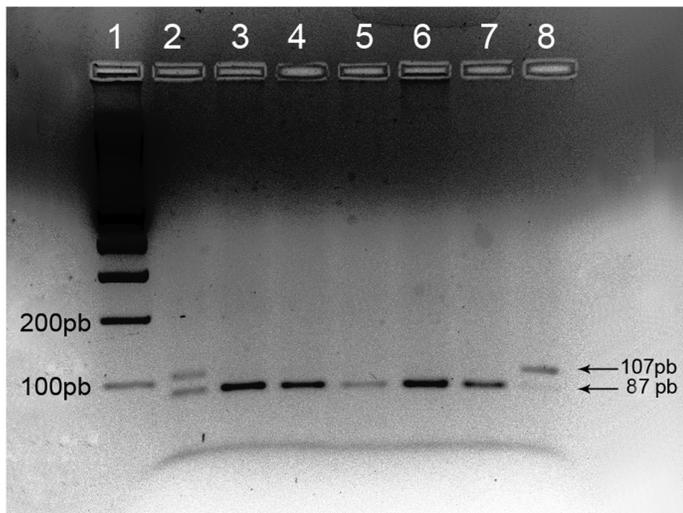


Figura 2 -Caracterização dos alelos do TNF, utilizando a enzima *NcoI*. Slots 2 e 8: Genótipo GA; Slots 3 - 7: Homozigoto, Genótipo GG; Slot 1: Marcador de peso molecular 100pb por eletroforese em gel de agarose a 2,5% corado com brometo de etídio



As figuras 3 e 4 mostram a distribuição dos genótipos de acordo com o sexo.

Figura 3 - Distribuição dos genótipos de acordo com o sexo masculino em cada grupo.

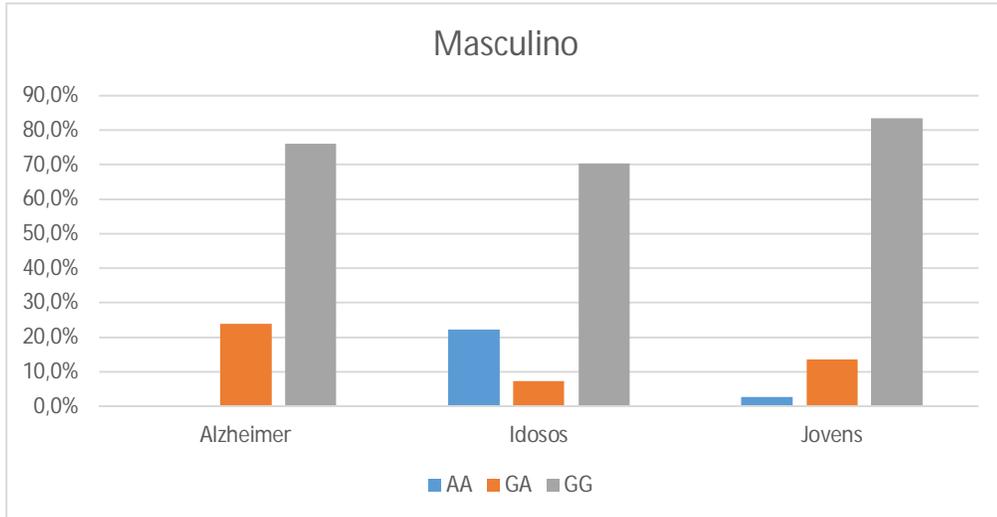
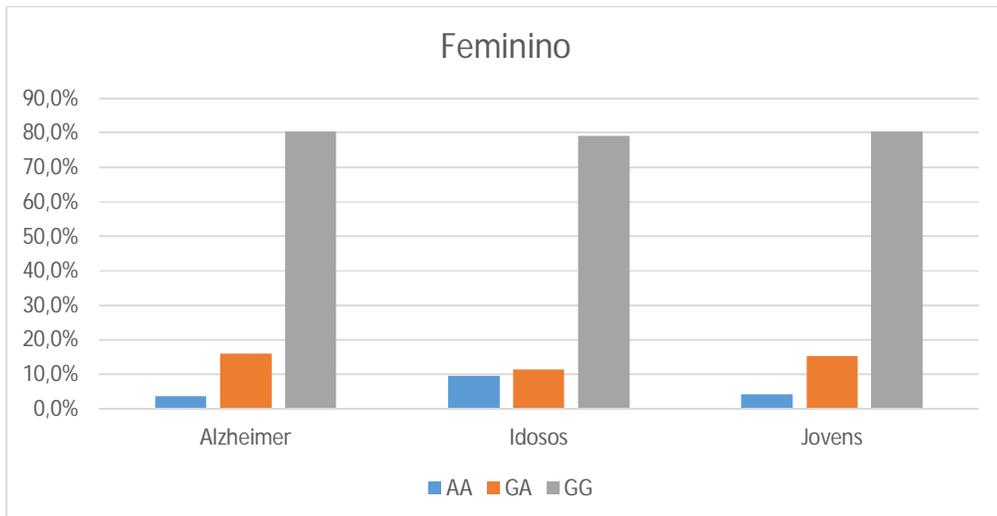


Figura 4 - Distribuição dos genótipos de acordo com o sexo feminino em cada grupo.



4.1 DOENÇA DE ALZHEIMER

No referido grupo, o genótipo mais frequente foi o GG e o menos frequente o AA, e quando comparado com os outros grupos foi o que mais apresentou o genótipo GA (18,5%), como demonstrado na Tabela 3.

4.2 CONTROLE IDOSO

O genótipo predominante no grupo foi o GG, seguido pelo AA, o qual dentre todos os grupos foi o que mais se expressou, e por último o genótipo GA, como pode-se verificar na Tabela 3.

4.3 CONTROLE JOVEM

O genótipo prevalecente no grupo Controle Jovem foi o GG, seguido pelo GA e tendo como o menos frequente o genótipo AA, como se pode observar na Tabela 3.

Tabela 3 - Frequência de cada genótipo nos grupos estudados.

		GENÓTIPO			TOTAL
		AA	GA	GG	
Grupos	Alzheimer	2 2,5%	15 18,5%	64 79,0%	81 100,0%
	Idosos	11 13,8%	8 10,0%	61 76,2%	80 100,0%
	Jovens	3 3,6%	12 14,5%	68 81,9%	83 100,0%
Total		16	35	193	244
		6,6%	14,3%	79,1%	100,0%

Fonte: Elaborado pela autora.

5 DISCUSSÃO

A doença de Alzheimer com início tardio é uma doença neurodegenerativa e é a forma mais comum de demência que afeta pessoas acima de 65 anos. A doença de Alzheimer é uma doença complexa com etiologia multifatorial. Confirmou-se que a inflamação possui um papel fundamental na patogenia da doença. Diversos estudos têm demonstrado a provável associação do polimorfismo do TNF com a patogenia da DA (MANOOCHEHRI et al., 2009).

Alguns estudos sugeriram que a produção de citocinas pró-inflamatórias, como o Fator de Necrose Tumoral (TNF) é aumentada nos tecidos cerebrais de pacientes com doença de Alzheimer tardia e desempenham um papel importante na patogenia da doença. Diversos estudos epidemiológicos também sugeriram que pacientes que fazem uso de medicamentos anti-inflamatórios têm um risco menor de desenvolver DA (AEDEBILI et al., 2011).

TNF é uma importante citocina pró-inflamatória que está desregulada em pacientes com doença de Alzheimer. O polimorfismo do Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF) pode afetar a resposta imune, inflamação, lesão tecidual e possivelmente a susceptibilidade de se ter a Doença de Alzheimer. O polimorfismo do TNF -308 G>A pode afetar a resposta inflamatória cerebral e o risco de se ter a doença de Alzheimer tardiamente (AEDEBILI et al., 2011). Em nosso estudo, o genótipo mais frequente no grupo de pacientes com Alzheimer foi o GG com o AA sendo o de menor frequência, principalmente em pacientes do sexo masculino. Observamos ainda uma diferença significativa na distribuição dos genótipos para o TNF entre os grupos. Porém, não foi observado uma diferença estatisticamente significativa que possam indicar uma possível associação do polimorfismo -308 do Fator de Necrose Tumoral com o desenvolvimento da doença de Alzheimer.

O sexo feminino parece ser o mais recorrente em se tratando do acometimento da DA, porém ainda não se sabe se isso é devido a algum fator genético ou pelo fato das mulheres apresentarem uma expectativa de vida maior (ALMEIDA et al., 2014). Por outro lado, os nossos resultados mostraram que a distribuição dos genótipos variou significativamente em relação ao sexo, com o sexo masculino tendo uma maior diferença entre as distribuições dos genótipos.

A incidência da doença de Alzheimer representa atualmente um importante problema de saúde pública, tanto em relação ao diagnóstico quanto a sua evolução (ALMEIDA et al., 2014).

6. CONCLUSÕES

1) a distribuição dos genótipos divergiu significativamente em relação ao sexo, sendo que o sexo masculino teve uma variação maior, enquanto que o sexo feminino se manteve um pouco mais equilibrado. Entretanto, em ambos os sexos o genótipo GG foi predominante, seguindo pelo GA e AA.

2) houve diferença estatisticamente significativa da distribuição dos genótipos para o Fator de Necrose Tumoral entre os grupos. O genótipo GG foi predominante em todos os grupos, entretanto os genótipos GA e AA apresentaram uma grande variação. O grupo Alzheimer é o grupo que apresenta o maior número de heterozigotos GA (18,5%). Enquanto que o grupo Controle Idoso foi o que apresentou maior número de genótipos homozigotos AA (13,8%), sendo assim, foi o grupo com mais alelos A (18,75%). Já o grupo Jovens Sadios foi o grupo com maior número de homozigotos GG (81,9%).

REFERÊNCIAS

1. MU, Y.; GAGE, F. H. Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer's disease. **Molecular Neurodegeneration**, Inglaterra, v 06., n. 6:85, Dez. 2011.
2. HAN, J-Y.; HAN, S-H. Primary Prevention of Alzheimer's Disease: Is It an Attainable Goal? **Journal of Korean Medical Science**, Coreia, v. 29, n. 7, p. 886-892, Jul. 2014.
3. HU, H. Y.; CUI, Z. H.; LI, H. Q.; WANG, Y. R.; CHEN, X.; LI, J. H.; XU, D. M.; ZHENG, G. Q. Fumanjian, a Classic Chinese Herbal Formula, Can Ameliorate the Impairment of Spatial Learning and Memory through Apoptotic Signaling Pathway in the Hippocampus of Rats with A β 1-40 -Induced Alzheimer's Disease. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, Estados Unidos, n. 942917, Jun. 2014.
4. HUNG, T. C.; LEE, W. Y.; CHEN, K. B.; CHAN, Y. C.; LEE, C. C.; CHEN, C. Y. C. *In Silico* Investigation of Traditional Chinese Medicine Compounds to Inhibit Human Histone Deacetylase 2 for Patients with Alzheimer's Disease. **BioMed Research International**, Estados Unidos, v. 2013, n. 769867, Jun. 2014.
5. ALMEIDA, M. C. S.; GOMES, C. M. S.; NASCIMENTO, L. F. C. Spatial distribution of deaths due to Alzheimer's disease in the state of São Paulo, Brazil. **São Paulo Medical Journal**, Brasil, v. 132, n. 4, Mai. 2014.
6. SUBASH, S.; ESSA, M. M.; AL-ASMI, A.; AL-ADAWI, S.; VAISHNAV, R. Chronic Dietary Supplementation of 4% Figs on the Modification of Oxidative Stress in Alzheimer's Disease Transgenic Mouse Model. **BioMed Research International**, Estados Unidos, v. 2013, n. 546357, Jun. 2014.
7. SENIYA, C.; KHAN, G. J.; UCHADA, K. Identification of potential Herbal Inhibitor of Acetylcholinesterase Associated Alzheimer's Disorder Using Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulation. **Biochemistry Research International**, Estados Unidos, v. 2010, n. 705451, Mar. 2014.
8. HAN, S. H.; JUNG-MOOK, I. Diverse Molecular Targets for Therapeutic Strategies in Alzheimer's Disease. **Journal of Korean Medical Science**, Coreia, n. 29(7), p. 893-902, Jul. 2014.
9. COUTINHO, C. A. A. C.; MARSON, F. A. L.; MARCELINO, A. R. B.; BONADIA, L. C.; CARLIN, M. P.; RIBEIRO, A. F.; RIBEIRO, J. D.; BETUZZO, C. S. TNF- α polymorphisms as a potential modifier gene in the cystic fibrosis. **International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics**, Estados Unidos, v. 5(2), p. 87-99, Mai. 2014.
10. BAZZAZ, J. T.; AMOLI, M. M.; TAHERI, Z.; LARIJANI, B.; PRAVICA, V.; HUTCHINSON, I. V. TNF- α and IFN- γ gene variation and genetic susceptibility to type 1 diabetes and its microangiopathic complications. **Journal of Diabetes and Metabolic Disorders**, Inglaterra, v. 11, n. 13:46, Abr. 2014.

11. TOLIDE-IE, H.; TABATABAEE, H. R.; KAMALI-SARVESTANI, E. Association between Tumor Necrosis Factor- α -308 G/A Polymorphism and Multiple Sclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Iranian Journal of Medical Science**, Irã, v. 15, n. 39(1), p. 2-10, Jan. 2014.
12. CORCHADO, S.; MÁRQUEZ, M.; MONTES de OCA, M.; CORES, P. R.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, C.; GIRÓN-GONZÁLEZ, J. A. Influence of Genetic Polymorphisms of Tumor Necrosis Factor Alpha and Interleukin 10 Genes on the Risk of Liver Cirrhosis in HIV-HCV Coinfected Patients. **Public Library of Science one (PLoS One)**, Estados Unidos, n. 8(6): e66619, Jun. 2013.
13. RENZO, L. Di; SARLO F.; PETRAMALA, L.; IACOPINO, G.; MONTELEONE, C.; COLICA, C.; LORENZO, A. De; Association between -308 G/A TNF- α Polymorphism and Appendicular Skeletal Muscle Mass Index as a Marker of Sarcopenia in Normal Weight Obese Syndrome. **Disease Markers**, Estados Unidos, v. 35(6), p. 615-623, Out. 2013.
14. YANG, L.; LU, R.; JIANG, L.; LIU, Z.; PENG, Y. Expression and genetic analysis of tumor necrosis factor- α (TNF- α) G-308A polymorphism in sporadic Alzheimer's disease in a Southern China population. **Brain Research**, Holanda, v. 1247, p. 178-181. 2009.
15. DELABY, C.; GABELLE, A.; BLUM, D.; SCHRAEN-MASCHKE, S.; MOULINIER, A.; BOULANGHIEN, J.; SÉVERAC, D.; BUÉE, L.; RÈME, T.; LEHMANN, S. Central nervous system and peripheral inflammatory processes in Alzheimer's disease: biomarker profiling approach. **Frontiers in Neurology**, Suíça, v. 6, article 181. Ago. 2015.
16. SUKHORUKOV, V. M.; MEYER-HERMANN, M. Structural Heterogeneity of Mitochondria Induced by the Microtubule Cytoskeleton. **Scientific Reports**, Inglaterra, n. 5:13924, Set. 2015.
17. MORRIS, J. C. The Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules. **Neurology**, Estados Unidos, v. 15, n. 10, Nov. 1993.
18. CIVEIRA, F.; GENEST, J.; POCOVI, M.; SALEM, D. N.; HERBERT, P. N. WILSON, P. W. SCHAEFER, E. J.; ODOVAS, J. M. The MspI restriction fragment length polymorphism 3' to the apolipoprotein A-II gene: relationship with lipids, apolipoproteins, and premature coronary artery. **Journal of Artherosclerosis Research**, Irlanda, v. 11, n. 1, Feb. 1992.
19. 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**, Estados Unidos, v. 15, n. 10, Jul. 1984.
20. FELDMAN, H. H.; JACOVA, C.; ROBILARD, A.; GARCIA, A.; CHOW, T.; BORRIE, M.; SCHIPPER, H. M.; BLAIR, M.; KERTESZ, A.; CHERTKOW, H.

Diagnosis and treatment of dementia: 2 Diagnosis. **Canadian Medical Association Journal**, v. 178, n. 7, p. 825-836, Mar. 2008.

21. MANOOCHERI, M.; KAMALI, K.; RAHGOZAR, M.; OHADI, M.; FARROKHI, H.; KHORSHID, H. R. K. Lack of Association between Tumor Necrosis Factor- α -308 G/A Polymorphism and Risk of Developing Late-Onset Alzheimer's Disease in an Iranian Population. **Avicenna Journal of Medical Biotechnology**, Irã, v. 1, n. 3, Out. 2009.

22. AEDEBILI, S. M.; YEGHANEH, T.; GHARESOURAN, J.; REZAZADEH, M.; FARHOUDI, M.; AYROMLOU, H.; TALEBI, M.; GHOJAZADEH, M. Genetic Association of TNF- α -308 G/A and -863 C/A polymorphism with late onset Alzheimer's Disease in Azeri Turk population of Iran. **Journal of Research in Medical Science**, Índia, v. 9, n. 2, Ago. 2011.

23. MAYNARD, S.; HEJL, A. M.; DINH, T. S.; KEIJZERS, G.; HANSEN, A. M.; DESLER, C.; MORENO-VILLANUEVA, M.; BÜRKLE, A.; RASMUSSEN, L. J. WALDEMAR, G.; BOHR, V. A. Defective mitochondrial respiration, altered dNTP pools and reduced AP endonucleases 1 activity in peripheral blood mononuclear cells of Alzheimer's disease patients. **Aging**, Estados Unidos, v. 7, n. 10, p. 793-815, Out. 2015.

24. CHENG, S.; LI, J.; LIU, W.; LIU, C.; SU, L.; LIU, X.; GUO, L.; MA, Y.; SONG, B.; LIU, J. LTA + 252 A>G polymorphism is associated with risk of nasal NK/T lymphoma in a Chinese population: a case-control study. **BioMed Central Cancer**, Inglaterra, Jun. 2015.

25. HARRIS, P.; SUAREZ, M. F.; SURACE, E.; MÉNDEZ, P. C.; MARTÍN, M. E.; CLARENS, M. F.; TAPAJÓZ, F.; RUSSO, M. J.; CAMPOS, J.; GUINJOAN, S. M.; SEVLEVER, G.; ALLEGRI, R. F. Cognitive reserve and A β 1-42 mild cognitive impairment (Argentina-Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative). **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, Nova Zelândia, Out. 2015.

ANEXO A - CARTA DO COMITÊ DE ÉTICA

FACULDADE DE MEDICINA DE
MARÍLIA-FAMEMA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise da expressão dos genes TNF e LRP1 e caracterização dos polimorfismos -850 C/T e -308 G/A do TNF na Doença de Alzheimer

Pesquisador: Arthur Antonio Ruiz Pereira

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 34355814.8.0000.5413

Instituição Proponente: FACULDADE DE MEDICINA DE MARILIA

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO
Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 951.024

Data da Relatoria: 10/02/2015

Apresentação do Projeto:

Número do Parecer: 776.802

Data da Relatoria: 03/09/2014

Objetivo da Pesquisa:

Número do Parecer: 776.802

Data da Relatoria: 03/09/2014

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Número do Parecer: 776.802

Data da Relatoria: 03/09/2014

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Número do Parecer: 776.802

Data da Relatoria: 03/09/2014

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Justificativa da Emenda: Esta emenda vem anexada ao trabalho devido a inclusão das análises de amostras de cérebro de pacientes com Doença de Alzheimer e controle, para o gene LRP1. Toda e qualquer alteração feita no corpo do projeto diz respeito a essa inclusão. Essa mudança se deve ao

Endereço: Rua: Orlando Righetti, 269
Bairro: Fragata **CEP:** 17.519-230
UF: SP **Município:** MARILIA
Telefone: (14)3402-1744 **Fax:** (14)3422-1079 **E-mail:** dirpos@famema.br

Continuação do Parecer: 951.024

fato dos resultados dos testes de eficiência da expressão do gene TNF no cérebro não mostrarem amplificação alguma. Logo o trabalho iria perder uma parte de seus ensaios e estudos. Por isso foi pensado o gene LRP1 que se comportou bem nos testes de eficiência e será usado nas amostras de cérebro, para quantificar sua expressão

Recomendações:

Nenhuma

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o CEP FAMEMA, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012 e na Norma Operacional Nº 001/2013 do CNS manifesta-se pela Aprovação do Projeto de Pesquisa.

Aprovado: Retirar Documentos assinados pelo CEP/FAMEMA após 13/02/15

Observação: O CEP FAMEMA informa que, a partir da data de aprovação, é necessário o envio de relatórios parciais (anualmente), e o relatório final, quando do término do estudo

MARILIA, 11 de Fevereiro de 2015


Assinado por:

Valdeir Fagundes de Queiroz
(Coordenador)

Endereço: Rua: Orlando Righetti, 269
Bairro: Fragata CEP: 17.519-230
UF: SP Município: MARILIA
Telefone: (14)3402-1744 Fax: (14)3422-1079 E-mail: dirpos@famema.br