



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I – CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

BRYGYT LENINA COSTA DA SILVA

**ESTUDO DE SUSCETIBILIDADE GENÉTICA À DEMÊNCIA EM
PACIENTES COM COMPROMETIMENTO COGNITIVO LEVE (CCL)**

**CAMPINA GRANDE
2022**

BRYGYT LENINA COSTA DA SILVA

**ESTUDO DE SUSCETIBILIDADE GENÉTICA À DEMÊNCIA EM
PACIENTES COM COMPROMETIMENTO COGNITIVO LEVE (CCL)**

Trabalho de Conclusão de Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharela em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Genética.

Orientador: Prof. Dr. Mathias Weller.

Coorientadora: Me. Steffany Larissa Galdino Galisa

**CAMPINA GRANDE
2022**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

S586e Silva, Bryggt Lenina Costa da.
Estudo de suscetibilidade genética à demência em pacientes com Comprometimento Cognitivo Leve (CCL) [manuscrito] / Bryggt Lenina Costa da Silva. - 2022.
29 p. : il. colorido.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2023.

*Orientação : Prof. Dr. Mathias Weller, Coordenação de Curso de Biologia - CCBS. *

Coorientação: Profa. Ma. Steffany Larissa Galdino Galisa , Departamento de Biologia - CCBS.

1. Alzheimer. 2. Demência. 3. Biologia molecular. I. Título
21. ed. CDD 572.8

Elaborada por Geovani S. de Oliveira - CRB - 15/1009

Biblioteca
Central
BC/UEPB

BRYGYT LENINA COSTA DA SILVA

ESTUDO DE SUSCETIBILIDADE GENÉTICA À DEMÊNCIA EM
PACIENTES COM COMPROMETIMENTO COGNITIVO LEVE (CCL)

Trabalho de Conclusão de Curso de
Bacharelado em Ciências Biológicas da
Universidade Estadual da Paraíba, como
requisito parcial à obtenção do título de
Bacharela em Ciências Biológicas.

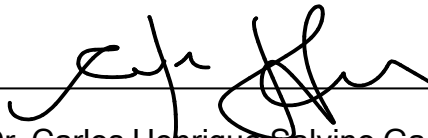
Área de concentração: Genética.

Aprovada em: 05/12/2022.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Mathias Weller (Orientador)
Universidade Estadual da Paraíba
(UEPB)



Prof. Dr. Carlos Henrique Salvino Gadelha Meneses
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Profa. Dra. Simone Silva dos Santos Lopes
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

Dedico esse trabalho a todas as pessoas que passaram pela minha vida e deixaram suas pegadas, sendo elas boas ou ruins.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Mathias, por ter me acompanhado e dado belas puxadas de orelha quando não entregava as coisas no prazo ou quando fazia algo de errado.

À professora Simone por ter me ingressado nesse ramo da genética que agora sou fascinada.

Ao meu pai Anério, a minha avô Bernardo por nunca desistirem de mim em relação aos meus estudos, mesmo quando me desviava do caminho e a minha tia Beta por me apoiar mesmo estando basicamente do outro lado do país.

Ao pessoal do laboratório, principalmente Steffany e Sônia por me guiarem no caminho certo na hora de fazer os experimentos e a Raysla por sempre me acalmar e tirar minhas dúvidas sobre os perrengues envolvendo o curso em geral. Aos meus colegas de curso pelo apoio durante meus momentos difíceis, pelos momentos nos quais choramos de rir e fizemos palhaçadas, pelas memórias da gente falando mal das pessoas que não gostamos e do desespero na realização de várias provas e por não desistirem de mim em momentos que eu com certeza teria.

“As flores nascem e depois murcham. As estrelas brilham, mas algum dia se extinguem. Comparado a isso, a vida do homem é nada mais do que um simples piscar de olhos, um breve momento. Nesse pouco tempo, as pessoas nascem, riem, choram, lutam, são feridas, sentem alegria, tristeza, odeiam alguém, amam alguém. Tudo isso em um só momento.”

- Shaka de Virgem, Cavaleiros do Zodíaco.

RESUMO

Introdução: Comprometimento Cognitivo Leve é um distúrbio caracterizado pela zona que distingue o envelhecimento natural da demência precoce dos indivíduos. Nas últimas décadas houve um aumento de interesse no estudo desse distúrbio pois, há uma relação entre ele e a Doença de Alzheimer (DA). Desde então, ensaios clínicos e populacionais foram realizados buscando tratamentos, causas e prevenções para essas patologias. **Objetivos:** Objetivou-se com este trabalho analisar o gene ApoE e seus alelos, associando-o com a suscetibilidade de desenvolvimento da Doença de Alzheimer (DA), utilizando da PCR para amplificar uma região do gene ApoE e realizando uma análise pragmática da literatura sobre o tema. **Metodologia:** O estudo foi realizado no Laboratório de Genética e Biologia Molecular, localizado no campus I da UEPB (Campina Grande — PB). Com auxílio de simulações *in silício* utilizando o BLAST e equipamentos de PCR e transiluminador, foi possível observar a relação entre o ApoE e a Doença de Alzheimer. **Resultados:** Com uma análise pragmática da literatura e das simulações *in silício* foi possível identificar erros registrados por alguns autores e reconhecer os primers e enzimas mais próximas do ideal para o estudo do fragmento do ApoE. **Discussão:** Foi identificado um erro na genotipagem do gene realizado por Crook(1994), além da má utilização da enzima Hha I na digestão dos fragmentos amplificados e sendo necessário a síntese das enzimas Afl III e Hae II para uma análise pragmática acerca do tema. **Conclusão:** O trabalho de Crook (1994) revelou-se impróprio para referência em pesquisas atuais em consideração a época em que foi feito, necessário utilização de autores que possuam pesquisas maisrecentes.

Palavras-Chave: doença de alzheimer; apoliproteína a; comprometimento cognitivo leve; apoe doenças.

ABSTRACT

Introduction: Mild Cognitive Impairment is a disorder characterized by the zone that distinguishes the natural aging of early dementia of individuals. In recent decades, there has been an increase in interest in the study of this disorder because there is a relationship between it and Alzheimer's disease and since then clinical and population trials have been conducted seeking treatments, causes and preventions for these pathologies. **Objectives:** The objective of this work was to analyze the ApoE gene and its allits, associating it with the susceptibility of development of AD, using PCR to amplify a region of the ApoE gene and performing a pragmatic analysis of the literature on the subject. **Methodology:** The study was carried out at the Laboratories of Genetics and Molecular Biology of and Plant Biotechnology, located on campus I of UEPB (Campina Grande - PB). With the aid of in vitro simulations using BLAST and PCR and transilluminator equipment, it was possible to observe the relationship between ApoE and AD. **Results:** With a pragmatic analysis of the literature and silicon simulations, it was possible to identify errors recorded by some authors and recognize the primers and enzymes closer to the ideal for the study of the ApoE fragment. **Discussion:** An error in the genotyping of the gene performed by Crook was identified in addition to the misuse of the enzyme Hha I in the digestion of amplified fragments and the synthesis of the enzymes Afl III and Hae II is necessary for a pragmatic analysis on the subject. **Conclusion:** The work of Crook (1994) proved to be inappropriate for reference in current research considering the time in which it was made, requiring the use of authors who have more recent research.

Keywords: alzheimer's disease; apolipoprotein e; mild cognitive impairment; apoe diseases.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	DNA genômico isolado. Há 9 amostras das 43 coletadas, utilizando gel de Agarose a 1% para visualização	19
.....		
Figura 2	Posições onde a enzima Hha I corta o fragmento amplificado utilizando os primers de Crook (1994), seguido das posições onde as enzimas Afl III e Hae II cortam o gene ApoE	20
.....		
Figura 3	Blast ao inserir a sequência dos iniciadores oligonucleotídeos reverso de Crook (1994)	21
.....		
Figura 4	A) Amplificação do gene ApoE (91 pb) utilizando os primers de Crook (1994) em um gel de Agarose a 1,5%; B) Amplificação do gene ApoE (452 pb) nos poços 1 e 2, utilizando os primers elaborados baseado no artigo de González (2021) em um gel de Agarose a 1,5%	22
.....		
Figura 5	Digestão in silício do gene ApoE utilizando a enzima Hha I	23
Figura 6	Digestão in silício do gene ApoE utilizando a enzima Afl III	24
Figura 7	Digestão in silício do gene ApoE utilizando a enzima Hae II	24

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ApoE	Apolipoproteína E
CCL	Comprometimento Cognitivo Leve
DA	Doença de Alzheimer
DF	Disbetalipoproteinemia Familiar
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase

LISTA DE SÍMBOLOS

μL	Microlitro
%	Porcentagem
mL	Mililitro
g	Gramma
®	Marca registrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	<i>Estudos Epidemiológicos</i>	13
2.2	<i>Aspectos Moleculares</i>	13
3	OBJETIVOS	15
3.1	<i>Objetivo geral</i>	15
3.2	<i>Objetivo específico</i>	15
4	METODOLOGIA	16
4.1	<i>Local de pesquisa</i>	16
4.2	<i>Tipo de estudo e caracterização da amostra</i>	16
4.3	<i>Extração de DNA</i>	16
4.4	<i>Planejamento do PCR in silício</i>	17
4.5	<i>Reação em cadeia de polimerase</i>	17
4.6	<i>Eletroforese em Gel de Agarose</i>	18
4.7	<i>Polimorfismos de fragmentos de restrição usando PCR in silício</i>	18
5	RESULTADOS	19
5.1	<i>O isolamento do DNA</i>	19
5.2	<i>PCR e Planejamento in silício do PCR</i>	19
5.3	<i>Polimorfismo de fragmentos de restrição in silício</i>	23
6	DISCUSSÕES	26
7	CONCLUSÃO	27
8	PERSPECTIVA.....	27
	REFERÊNCIAS	28

1 INTRODUÇÃO

Descreve-se como Comprometimento Cognitivo Leve (CCL) a zona de transição entre o envelhecimento natural e a demência precoce, representando uma condição onde os indivíduos apresentam uma perturbação na memória maior do que previsto para idade (GARCIA et al, 2008). Nas últimas décadas, com o avanço nos estudos envolvendo o CCL, conseguiu-se categorizar essa condição levando em consideração a heterogeneidade genética em dois subtipos: CCL amnésico (aMCI) e CCL não amnésico (naMCI), ambos possuindo variações de domínio único e múltiplo (CONG et al, 2022).

Os principais fatores de risco identificados atualmente para CCL envolve idade, educação, medicamentos para hipertensão, infartos, lesões da substância branca, depressão e o alelo $\epsilon 4$ do gene ApoE (RITCHIE, 2004). Apesar da presença do alelo $\epsilon 4$ oferece um maior risco do indivíduo de ser acometido pela DA (Doença de Alzheimer) , tal fator não assegura que a patologia de fato seja desenvolvida, estendendo para que a genotipagem do gene ApoE não seja usada como diagnose principal na distinção de pacientes portadores de CCL com maior risco de evolução do quadro para DA (VEGA, NEWHOUSE, 2014). Práticas como exercícios aeróbicos, interações sociais e atividades que estimulem o cérebro podem ajudar a diminuir os riscos de decréscimo cognitivo posterior (LANGA, LEVINE 2014).

O presente estudo foi realizado em colaboração com o projeto de doutorado de Kedma Anne Lima Gomes, que é um ensaio clínico maior em pacientes contendo o quadro de CCL amnésico e contém o objetivo de analisar o gene ApoE e seus alelos, associando-o com a suscetibilidade de desenvolvimento da DA, utilizando de uma averiguação pragmática da literatura de estudos anteriores envolvendo o gene para uma experimentação *in vitro*. É importante esse tipo de estudo para a saúde, pois, contribui no aumento de métodos de identificação e tratamento desses distúrbios já que a expectativa de vida da população está aumentando e com isso a permanência de doenças crônicas que ocorrem com mais frequência na terceira idade.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Estudos epidemiológicos

Diferenças de tamanho amostral e procedimentos identificativos conduziram a uma discordância entre os métodos, resultando na variação entre 5% e 29% da predominância da DA mundialmente, sendo registrado uma frequência de 8 a 58 novos casos a cada 1000 por ano, havendo 15% de possibilidade da CCL evoluir para o estágio demencial (RITCHIE, 2004). No Brasil foi encontrado uma predominância de 6,1% da doença, com taxa anual de sua evolução para DA de 8,5% e incidência de 13,2 a cada 1000 pessoas por ano (BRUCKI, 2013).

2.2 Aspectos moleculares

O gene Apolipoproteína E humano é uma glicoproteína sérica, constituído por 299 aminoácidos, localizado no cromossomo 19q13.2, ele é polimórfico e possui três isoformas, que são ApoE2, ApoE3 e ApoE4, com os alelos correspondentes mais comuns (ϵ 2, ϵ 3 e ϵ 4) que alteram a estrutura e função da ApoE e, conseqüentemente, trazendo distúrbios bioquímicos relacionados ao gene (GANAIÉ et al, 2019; OJOPI et al, 2004). Os isoformas ApoE diferem por substituições de aminoácidos únicos com intercâmbio de cisteína arginina em duas posições (112 e 158): apoE2 (Cys112, Cys158), apoE3 (Cys112, Arg158) e apoE4 (Arg112, Arg158), sendo o alelo ϵ 3 a variante mais comum do gene (OJOPI et al, 2004).

O alelo ϵ 4 é a variante contendo o maior fator de risco por estar relacionado a diversas patologias como doenças cardiovasculares, derrames, doença de Parkinson, DA, entre outras desordens neurodegenerativas (BELLOY et al.). Há também estudos mostrando a relação entre o alelo ϵ 2 e a DF (Disbetalipoproteinemia Familiar), sendo 90% dos diagnósticos são causados pela variação homozigótica do gene e esse alelotambém apresentou uma relação preventiva no desenvolvimento da DA (HEIDEMANN et al, 2022; SALVADÓ et al, 2021). O maior fator de risco de desenvolvimento tardio da DA esporádica e familiar está associado ao ϵ 4, os indivíduos que possuem a variação homozigótica contêm cerca de oito vezes mais chance de desenvolver a doença em comparação aos portadores do alelo ϵ 3 (LAMB et al, 1998).

Kukull et al. (1996) menciona que antes que fosse descoberta a associação entre DA e ApoE, o gene era estudado extensivamente pela sua potencial associação com doenças cardíacas por regular o transporte de colesterol e o metabolismo de lipídeos. Com a determinação do alelo $\epsilon 4$ como fator de risco para DA, o colesterol pode estar associado a patologia da doença (OJOPI et al, 2004).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Analisar o gene ApoE e seus alelos, associando-o com a suscetibilidade de desenvolvimento da DA, utilizando de uma averiguação pragmática da literatura de estudos anteriores envolvendo o gene para uma experimentação *in vitro*.

3.2 Objetivos Específicos

- Extrair DNA dos pacientes.
- Realizar a amplificação da região do gene APOE por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)
- Realizar Eletroforese em Gel de agarose para verificação da amplificação do gene.

4 MÉTODOS

4.1 Local de Pesquisa e Infraestrutura usada

A pesquisa foi realizada entre Maio de 2022 e setembro de 2022 no Laboratório de Genética e Biologia Molecular e no laboratório de Biotecnologia Vegetal, ambos localizados no edifício Três Marias da Universidade Estadual da Paraíba — UEPB. Eles contam com toda a estrutura necessária para a avaliação do material genético.

4.2 Tipo de estudo e Caracterização da Amostra

Os pacientes fazem parte de um ensaio clínico randomizado. A população contempla 43 indivíduos com CCL, residentes na cidade de João Pessoa – PB. Dos 43 indivíduos com comprometimento cognitivo leve (CCL), 30 tiveram comprometimento cognitivo leve (casos) e 13 servem como grupo controle.

4.3 Extração de DNA

De cada indivíduo foi coletado de 5ml de sangue periférico através de tubos de coleta a vácuo com EDTA. Para a extração do DNA (*Deoxyribonucleic Acid*), foi utilizado o *EasyPure® Blood Genomic DNA KIT*. Para o procedimento de extração de DNA dos indivíduos, foi realizado o seguinte protocolo em 7 etapas:

- Foi adicionado 250 µL de sangue, 20 µL de Proteinase K, 500 µL de BB3 em um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL estéril, colocando no vórtex por 15 segundos e depois incubadas em temperatura ambiente por 10 minutos;
- Foi centrifugado por 10 segundos em uma mini centrífuga, adicione todo o lisato em uma coluna de centrifugação. Centrifugar a 12.000xg por 1 minuto e descartado o fluxo;
- Foi adicionado 500 µL de CB3 e centrifugue o tubo a 12.000xg por 30 segundos e descartado o fluxo;

- Foi adicionado 500 μL de WB3, centrifugue o tubo a 12.000xg por 30 segundos e descarte o fluxo;
- A etapa 4 foi repetida 1 vez;
- foi colocado a coluna de centrifugação em um tubo de coleta, centrifugando a coluna vazia a 12.000xg por 2 minutos para remover qualquer WB3 residual, secando a coluna vazia ao ar em temperatura ambiente por 5 minutos;
- Foi colocado a coluna de centrifugação em um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL estéril, adicionando 50 μL de tampão de eluição ao centro da coluna e incubar em temperatura ambiente por 2 minutos, no final da incubação, foi centrifugado a 12.000xg por 1 minuto para eluir o DNA. O DNA extraído foi armazenado a -20°C .

4.4 Planejamento do PCR *in silício*

Foi realizado uma revisão de literatura para identificar *primers* que foram usados em estudos anteriores para amplificar a parte do gene de Apolipoproteína E e que contém os polimorfismos em questão. A pesquisa foi realizada na plataforma PubMed, aplicando as palavras chaves “Apolipoproteína E”, “PCR”, “ApoE doenças genéticas”, “Doença de Alzheimer”, “ApoE alelos” “ApoE4 doenças” e “Comprometimento Cognitivo Leve”.

4.5 Reação em cadeia de polimerase

Baseando-se no artigo de CROOK (1994) os seguintes primers foram usados: F: 5' -

TCCAAGGAGCTGCAGGCGGCGCA-3'

R: 5'- ACAGAATTCGCCCCGGCCTGGTACTACTGCCA-3'.

O seguinte protocolo foi usado para realizar os PCR, totalizando um volume de 50 μL por amostra: 36,5 μL de água MiliQ, 5 μL de Tampão (Contendo Mg^{2+}), 4 μL de DNTP, 1,5 μL de cada prime, 0,5 μL de Taq Polimerase e 1 μL de DNA (ref).

As condições ideais de PCR foram encontradas com uma desnaturação inicial de 94°C por 5 min, seguido por 30 ciclos de uma etapa de desnaturação a 94°C por 1 min, uma etapa de anelamento a 68°C por 2 min, uma etapa de extensão a 74°C por 1 min e uma etapa de extensão final a 74°C por 5 min completando a amplificação.

4.6 Eletroforese em Gel de Agarose

Para visualização do DNA genômico e dos fragmentos de PCR, foi utilizado o gel de Agarose a 1%, com tempo de corrida de 50 minutos a 90 volts. O gel foi feito a partir de 1g de Agarose em pó e 100mL de tampão TBE 1x e adicionado 10 µL de Diamond Nucleic Acid Dye. Além disso, foi utilizado o Loading Dye (6x) e um Ladder de 100bp como referência. Ao término da corrida, o gel foi colocado em um transluminador (LOCCUS) para visualização dos resultados.

4.7 Polimorfismo de fragmentos de restrição usando a reação em cadeia de polimerase PCR *in silício*

É planejado usar a técnica de Análise de polimorfismos de fragmentos de restrição utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR - RFLP). Para prever o tamanho dos fragmentos de digestão foi usado a ferramenta online “Restriction Mapper” (versão 3; <https://www.restrictionmapper.org/>). O fragmento amplificado foi copiado na máscara do programa e digerido *in silício* para prever o tamanho dos fragmentos.

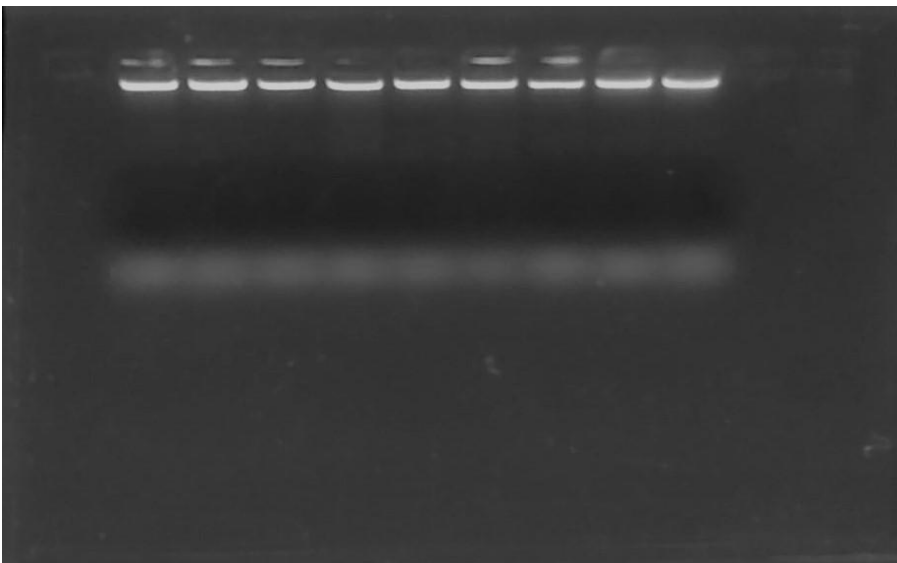
A sequência exata do gene *Apolipoproteína E* contendo os polimorfismos Cisteína-Arginina nas posições dos aminoácidos 112 e 158, foi obtido pelo “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST) na página do “National Library of Medicine” (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Originalmente foram usadas curtas sequências de primers publicados (CROOK, 1994) para encontrar o gene *Apolipoproteína E*.

5 RESULTADOS

5.1 O isolamento do DNA

O isolamento do DNA genômico funcionou para todas as 43 amostras.

Figura 1: DNA genômico isolado. Há 9 amostras das 43 coletadas, utilizando gel de Agarose a 1% para visualização.



Fonte: Foto elaborada por Steffany Larissa (2022).

5.2 PCR e Planejamento *in silício* do PCR

O autor do estudo é ciente que o planejamento do PCR deveria preceder a realização dele. No entanto, baseando-se no trabalho de CROOK 1994 foram usados os primers desenvolvidos neste artigo.

A princípio o PCR foi estabelecido utilizando os mesmos primers e ciclagem de PCR utilizadas no artigo de Crook et al. (1994), que tinha como objetivo criar um método de genotipagem mais rápida, barata, segura e confiável que pudesse analisar uma grande quantidade de amostras, o que se via necessária para obter o diagnóstico precoce da DA. Entretanto, ao fazer uma pesquisa mais sistemática, foi descoberto

que estão cadastrados na database.

Figura 3: Blast ao inserir a sequência do prime reverso de Crook.

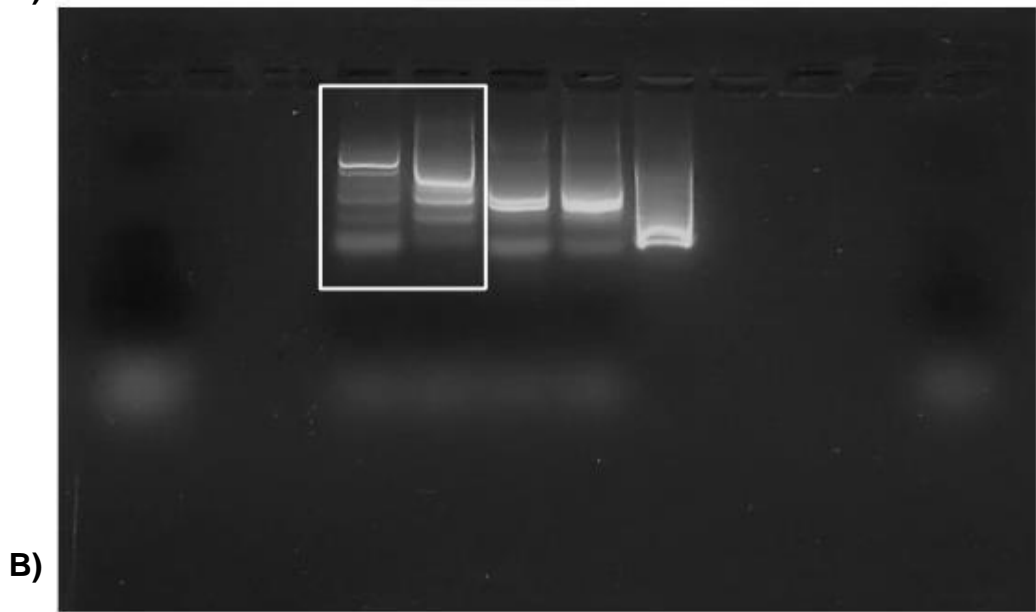
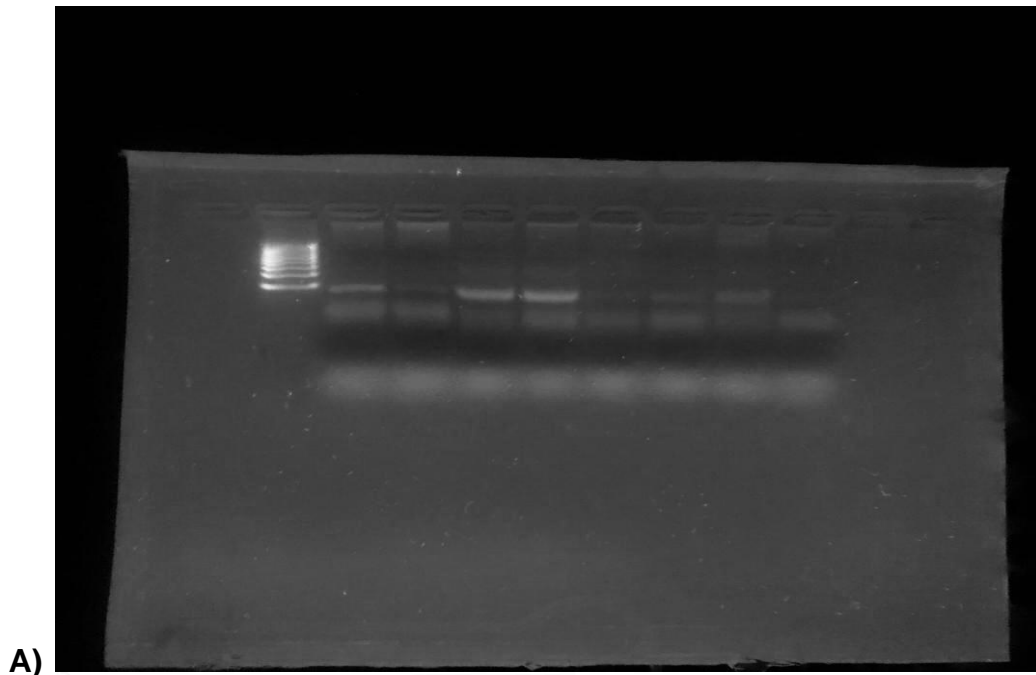
The screenshot displays the NCBI BLAST interface. At the top, the NIH logo and 'National Library of Medicine' are visible. The search results are for 'BLAST® » blastn suite » results for RID-PX7EEBP4013'. The 'Job Title' is 'Nucleotide Sequence'. The 'RID' is 'PX7EEBP4013' with a search expiration time of '11-13 02:09 am' and a 'Download All' link. Other fields include 'Program' (Citation), 'Database' (nt), 'Query ID' (Ic|Query_3971), 'Description' (None), 'Molecule type' (dna), 'Query Length' (31), and 'Other reports'. The 'Filter Results' section has three columns: 'Percent Identity', 'E value', and 'Query Coverage', each with two empty input boxes and a 'to' label. 'Filter' and 'Reset' buttons are present. A yellow banner at the bottom contains a warning icon and the text: 'No significant similarity found. For reasons why, click here'.

Fonte: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (2022)

Utilizando o artigo de González et al (2021), novos primers foram sintetizados e usados em uma nova PCR, cuja amplificação se mostrou com uma melhor visualização em comparação aos PCR. Os seguintes primers foram utilizados se baseando no artigo de González:

F: 5' - GAGGAGATGGGCAG - 3'
R: 5' - GCCTACAAATCGGAACTGG - 3'

Figura 4: A) amplificação do gene ApoE (91 pb) utilizando os primers de Crook (1994) em um gel de Agarose a 1,5%; B) Amplificação do gene ApoE (452 pb) nos poços 1 e 2 , utilizando os primers elaborados baseado no artigo de González (2021) em um gel de Agarose a 1,5%.



Fonte: Fotos elaboradas por Steffany Larissa (2022)

5.3 Polimorfismo de fragmentos de restrição *in silício*

As digestões *in silico* não se baseiam nas informações de CROOK - 1994 -mas no fragmento do gene *ApoE* obtido na database:

```
gcacggctgtccaaggagctgcaggcggcgcaggcccggctgggcgcgacatggaggacgtgtgcgccgcct
ggtgcagtaccgcggcgaggtgcaggccatgctcggccagagcaccgaggagctgcgggtgagcctgcctcca
cctgcgcaagctgcgtaagcggctcctccgcgatgccgatgacctgcagaagcgcctggcagtgaccaggccggg
gccccg
```

Figura 5: Digestão *in silício* do gene ApoE utilizando a enzima Hha I.

Enzymes: HhaI

Length	5' Enzyme	5' Base	3' Enzyme	3' Base	Sequence
91	HhaI	47	HhaI	137	CGGACATGGA GGACGTGTGC GGCCGCCTGG TGCAGTACCG CGGCGAGGTG CAGGCCATGC TCGGCCAGAG CACCGAGGAG CTGCGGGTGC G
48	HhaI	156	HhaI	203	CAAGCTGCGT AAGCGGCTCC TCCGCGATGC CGATGACCTG CAGAAGCG
31	HhaI	204	none	234	CCTGGCAGTG TACCAGGCCG GGGCCCCGCA G
30	none	1	HhaI	30	GCACGGCTGT CCAAGGAGCT GCAGGCGGCG
18	HhaI	138	HhaI	155	CCTCGCTCC CACCTGCG
16	HhaI	31	HhaI	46	CAGGCCCGGC TGGGCG

Fonte: Elaborado pela Autora Brygyt Lenina (2022).

Figura 6: Digestão *in silício* do gene ApoE utilizando a enzima Afl III.

Enzymes: AflIII

Length	5' Enzyme	5' Base	3' Enzyme	3' Base	Sequence
171	AflIII	60	none	230	CGTGTGCGGC CGCCTGGTGC AGTACCGCGG CGAGGTGCAG GCCATGCTCG GCCAGAGCAC CGAGGAGCTG CGGGTGCGCC TCGCCTCCA CCTGCGCAAG CTGCGTAAGC GGCTCTCCG CGATGCCGAT GACCTGCAGA AGCGCCTGGC AGTGTACCAG GCCGGGGCCC G
59	none	1	AflIII	59	GCACGGCTGT CCAAGGAGCT GCAGGCGGCG CAGGCCCGGC TGGGCGCGGA CATGGAGGA

Fonte: Elaborado pela Autora Brygyt Lenina (2022).

Figura 7: Digestão *in silício* do gene ApoE utilizando a enzima Hae II.

Enzymes: HaeII

Length	5' Enzyme	5' Base	3' Enzyme	3' Base	Sequence
204	none	1	HaeII	204	GCACGGCTGT CCAAGGAGCT GCAGGCGGCG CAGGCCCGGC TGGGCGCGGA CATGGAGGAC GTGTGCGGCC GCCTGGTGCA GTACCGCGGC GAGGTGCAGG CCATGCTCGG CCAGAGCACC GAGGAGCTGC GGGTGCGCCT CGCCTCCCAC CTGCGCAAGC TCGTAAGCG GCTCTCCGC GATGCCGATG ACCTGCAGAA GCGC
26	HaeII	205	none	230	CTGGCAGTGT ACCAGGCCGG GGCCCG

Fonte: Elaborado pela Autora Brygyt Lenina (2022)

6 DISCUSSÃO

Ao observar as digestões in silício do gene ApoE utilizando as enzimas Hha I, Afl III e Hae II, percebe-se que o tamanho dos fragmentos obtidos com a enzima Hha I são muito pequenos para serem visualizados no gel de Agarose mesmo sendo utilizado uma concentração maior nesse gel, indicando que para a enzima em questão, teria que utilizar o gel de poliacrilamida para visualizar os fragmentos resultantes da PCR. Em comparação, o tamanho dos fragmentos gerados pela digestão in silício das enzimas Afl III e Hae II os fragmentos são maiores e seriam mais facilmente visualizados no gel. A enzima Hha I se mostrou inapropriada para digestão do gene abordado e se mostrou necessário financiamento para continuação deste projeto envolvendo as enzimas Afl III e Hae II, que se portaram ideias para digestão apropriada dos fragmentos amplificados do ApoE com a utilização dos primers sintetizados a partir do artigo de González para pacientes contendo o alelo $\epsilon 4$ como predisposição ao desenvolvimento de DA.

7 CONCLUSÃO

Com a identificação do equívoco documentado por Crook (1994), conclui-se que seu trabalho não pode ser referenciado atualmente por divergências tecnológicas entre as épocas, sendo necessário a utilização de outros autores cujas pesquisas possuem datações recentes, para assim evitar com que haja conflitos.

8 PERSPECTIVAS

Para a continuação desse projeto será necessário financiamento para poder realizar as experimentações laboratoriais utilizando as enzimas Afl III e Hae II que necessitam ser encomendadas para assim melhor investigar a relação entre o gene ApoE e a DA dentro da amostragem usada e dos primers que se mostraram mais próximos do ideal para o ensaio.

REFERÊNCIAS

- BELLOY, M. E.; NAPOLIONI, V.; GREICIUS, M. D. A quarter century of APOE and Alzheimer's disease: progress to date and the path forward. **Neuron**, v. 101, n. 5, p. 820-838, 2019.
- BRUCKI, S. M. D. Epidemiology of mild cognitive impairment in Brazil. **Dement Neuropsychol** [Internet] 2013 [cited 2017 Mar 22]; 7 (4): 363-6.
- CONG, Lin et al. Mild cognitive impairment among rural-dwelling older adults in China: A community-based study. **Alzheimer's & Dementia**, v. 19, n. 1, p. 56-66, 2023.
- CROOK, R.; HARDY, J.; DUFF, K.. Single-day apolipoprotein E genotyping. **Journal of neuroscience methods**, v. 53, n. 2, p. 125-127, 1994.
- GARCIA, A. N. *et al.* APOE- ϵ 4 polymorphism and cognitive deficit among the elderly population of Fernando de Noronha. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 66, p. 298-302, 2008.
- GANAI, H. A. *et al.* Association of APOE gene polymorphism with stroke patients from rural Eastern India. **Annals of Indian Academy of Neurology**, v. 23, n. 4, p. 504, 2020.
- GONZÁLEZ, R. D. *et al.* APOE variants in an Iberian Alzheimer cohort detected through an optimized sanger sequencing protocol. **Genes**, v. 12, n. 1, p. 4, 2020.
- HEIDEMANN, B. E. *et al.* Establishing the relationship between familial dysbetalipoproteinemia and genetic variants in the APOE gene. **Clinical Genetics**, v. 102, n. 4, p. 253-261, 2022.
- HIXSON, J. E.; VERNIER, D. E. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. **Journal of lipid research**, v. 31, n. 3, p. 545-548, 1990.
- KUKULL, W. A. *et al.* Apolipoprotein E in Alzheimer's disease risk and case detection: a case-control study. **Journal of clinical epidemiology**, v. 49, n. 10, p. 1143-1148, 1996.
- LANGA, K. M.; LEVINE, D. A. The diagnosis and management of mild cognitive impairment: a clinical review. **Jama**, v. 312, n. 23, p. 2551-2561, 2014.
- LAMB, H. *et al.* Apolipoprotein E and alpha-1 antichymotrypsin polymorphism genotyping in Alzheimer's disease and in dementia with Lewy bodies Distinctions between diseases. **Neurology**, v. 50, n. 2, p. 388-391, 1998.
- OJOPI, E. P. B.; BERTONCINI, A. B.; DIAS NETO, E. Apolipoproteína E e a doença de Alzheimer. **Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)**, v. 31, p. 26-33, 2004.
- RITCHIE, K.. Mild cognitive impairment: an epidemiological perspective. **Dialogues in clinical neuroscience**, v. 6, n. 4, p. 401-408, 2004.
- SALVADÓ, G. *et al.* The protective gene dose effect of the APOE ϵ 2 allele on gray matter volume in cognitively unimpaired individuals. **Alzheimer's & Dementia**, v. 18, n. 7, p.

1383-1395, 2022.

VEGA, J. N.; NEWHOUSE, P. A. Mild cognitive impairment: diagnosis, longitudinal course, and emerging treatments. **Current psychiatry reports**, v. 16, p. 1-11, 2014.