



Universidade Federal de Pernambuco
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

JOSÉ ERITON GOMES DA CUNHA

**Análise da frequência das variações M129V (rs1799990) e E200K (rs28933385)
do gene PRNP em pacientes brasileiros com Doença de Alzheimer**

Recife, 2012

JOSÉ ERITON GOMES DA CUNHA

**Análise da frequência das variações M129V (rs1799990) e E200K (rs28933385)
do gene PRNP em pacientes brasileiros com Doença de Alzheimer**

Dissertação apresentada ao programa de
Mestrado em Biologia Aplicada à Saúde da
Universidade Federal de Pernambuco, como
parte dos requisitos para obtenção do grau de
mestre em Ciências Aplicada à Saúde.

Orientador: João Ricardo Mendes de Oliveira

RECIFE

2012

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

C972a

Cunha, José Eriton Gomes da

Análise da frequência das variações M121V (rs1799990) e E200K (rs2893385) e do gene PRNP em pacientes brasileiros com doença de Alzheimer / José Eriton Gomes da Cunha. – Recife: O Autor, 2012.

60 folhas: il., fig., tab.

Orientador: João Ricardo Mendes de Oliveira

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde, 2012.

Inclui bibliografia e anexos

- 1. Alzheimer, Doença de - 2. Variação (Biologia) 3. Polimorfismos (genética) I. Oliveira, José Eriton Gomes (Orientador) II. Título.**

616.831

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2012-146

**Análise da frequência das variações M129V (rs1799990) e E200K (rs28933385)
do gene PRNP em pacientes brasileiros com Doença de Alzheimer**
José Eriton Gomes da Cunha

Banca Examinadora

Prof. Dr. João Ricardo Mendes de Oliveira

Orientador – UFPE / Dept. Neuropsiquiatria/LIKA

Prof.^a. Dr^a. Clélia Maria Franco

FIR / Dept. Neuropsiquiatria

Prof. Dr. Lucas André Cavalcanti Brandão

UFPE / Dept. Patologia

RECIFE

2012

Prefácio

“All my days I've waited for the sign
The one that brings me closer to isle of Avalon
I can feel the power flowing through my veins
My heart is beating louder, close to Avalon”

“Todos os meus dias eu espero o sinal
Aquele que me trará mais perto da Ilha de Avalon
Eu posso sentir o poder fluindo pelas minhas veias
Meu coração está batendo mais forte, perto de Avalon”
(Iron Maiden – Isle of Avalon)

Agradecimentos

Gostaria de deixar meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que me deram suporte, críticas, sugestões, forças e muito mais nesses dois anos de mestrado. Tenho a maior dificuldade de demonstrar o quanto fico agradecido por tudo, Filipe Santos que o diga!

Agradeço em especial à minha amada família por ter me dado educação, carinho, amor, suporte, críticas e por me fazer quem eu sou como pessoa. Se gostam de como eu sou, culpem eles! Obrigado por tudo seu Severino, dona Maria Tereza, Elder, Elaine (minha mentora dessa língua que não sei muito bem, mesmo após vinte e nove anos). Às minhas tias, de sangue, Elza, Biuzinha (chamem aí de Severina, se tiverem coragem), Edileuza, Graça, Teresinha (minha pequena bióloga), a guerreira Marli. Aos meus tios Roberto, Paulo, Manoel, Toninho, Zé e aos primos e primas: Celina, Natália, William, Alcione, Lidiane (a única planta que eu gosto), Henrique e a todos os meus primos e familiares de São Paulo.

Agradeço os amados e queridos professores. A todos que me deram tanto apoio e vão me “aturar” por mais 4 anos! Como já disse a meu orientador, João Ricardo M. de Oliveira, não há palavras para agradecer por tudo que ele me fez desde 2007, muito obrigado mesmo. Aos professores José Luiz e Luiz Carvalho, obrigado pelo conhecimento, conversas, ensinamentos não acadêmicos e orientações. Às Professoras Dany e Rosângela pelo suporte.

Aos amigos, que são outra espécie de família, obrigado por terem me dado tantos momentos fantásticos e com toda certeza aos próximos que virão. Espero não esquecer nenhum nome, mas me perdoem, pois tenho MUITOS bons amigos. Vou tentar dividir em grupos, para não me esquecer de ninguém!

Aos amigos da faculdade nos quais tive o prazer de cursar e chatear SEMPRE com meus assuntos de prion (fazer o quê se ela é espetacular?). Agradeço a todas as “tias” e amigos. Em especial, por ter mais afinidades, gostos e saídas juntos, fora o grande carinho e amor: Caio e Filipe (Blood Brothers), Livia, Morgana, Sarinha e Cassinha.

Obrigado a todos do RPG. A primeira “turma”: Pedro, Damásio, Ogeid, Luiz Carlos, Vicente (forças cara), Renatinho (infantaria, sempre), Biiinho, Meu e a segunda “turma”: Berg, Rubão (sim, ele está vivo), KV, Trop, Piauí, Beça, Meu (de novo).

Aos grandes amigos do amado LIKA (minha primeira ou segunda casa, não faço ideia). A todos os que pertencem aos Laboratórios de Biotecnologia, Biossensores, Virologia/Microscopia Eletrônica, Patologia, Bioquímica e Microbiologia. E claro, ao meu adorável laboratório de Biologia Molecular representado por Aíla, Jéssica Fragoso, Erik, Juan, Eliane, Marcela, Monique, Marek, Juliana Nunes e aos demais.

Aos amados parceiros do grupo Psiquiatria Biológica: Danyllo, Lylyan, Manuela, Roberta, Regina, Samy e Thalita, obrigado pelo carinho e pela amizade.

Obrigado aos amigos da ppg-LIKA que fizeram esses dois anos maravilhosos e que contribuíram para esse produto final. Em especial a Sérgio e a André pela ajuda nas “continhas”. Um agradecimento especial também para a nossa mais do que secretária e grande amiga da ppg-LIKA, Eliete. Obrigado por me aturar e me ajudar nesses anos.

Deixo meus agradecimentos às agências de fomento: Capes e CNPq pelos financiamentos.

RESUMO

A Doença de Alzheimer (DA) e a Doença de Creutzfeldt-Jakob (DCJ) apresentam caráter neurodegenerativo, ocasionadas pelo acúmulo extracelular de proteínas insolúveis. Dentre alguns fatores de risco, as mutações nos códons M129V e E200K do gene PRNP são os mais importantes na DCJ. Alguns estudos foram realizados com o códon 129, sendo bastante controversos. Este trabalho teve como objetivo verificar a influência dos códons 129 e 200 e a presença da mutação E200K na DA. 145 amostras de DNA de pacientes com DA e 198 controles foram genotipadas para os códons 129 e 200 através da técnica da PCR e digestão enzimática com as enzimas NspI para o códon M129V e BsmAI, para o códon 200. Onze pacientes e oito controles foram sequenciados com o MegaBace1000. Quarenta e dois pacientes e quarenta e dois controles foram genotipados para o códon 129 sendo 16 MM, 20 MV e 6 VV nos pacientes e 24 MM, 15 MV e 3 VV nos controles. Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas. Para a mutação E200K, 61 pacientes e 75 controles foram genotipados, não ocorrendo mutação em nenhuma amostra. Nossos dados corroboram com outros grupos mostrando que o códon 129 parece não estar associado a DA. A baixa frequência da mutação E200K pode justificar a ausência desta na nossa amostragem, o que precisa ser confirmado com maior número de amostras, com devida atenção pela possível estratificação associada a grupos étnicos e outros fatores como co-segregação de outros genes associados ao PRNP. Este trabalho contribuiu para um melhor conhecimento do perfil neuroepidemiológico da população local.

Palavras chaves: DOENÇA DE ALZHEIMER; DOENÇA PRIÔNICA; PRÍON; VARIAÇÃO GENÉTICA; BRASIL.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) and Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) are neurodegenerative disorders with some similar clinical findings and both are caused by the accumulation of insoluble proteins in the Brain. Some risk factors were already described such as genetic polymorphisms and mutations. The codon 129 and mutation E200K at PRNP gene are the most important CJD risk factor in studies with families and populations. Clinical and Biological similarities between these two neuropsychiatric conditions prompted various studies aiming to correlate the influence of codon 129 and the presence of the E200K mutation in AD. In this study we evaluated the variants frequency for the codon 129 and E200K mutation at PRNP gene in AD patients and controls of a Brazilian population. DNA samples from 145 patients and 198 controls were genotyped for codon 129 and 200 by PCR and enzymatic digestion with enzymes with NSPI and BsmAI, respectively. Eleven patients and eight controls were sequenced with MegaBace1000 for both variations. Forty-two patients and controls were genotyped for the codon 129. In patients, the genotype distribution was 16 homozygous for methionine, 6 homozygous for Valine and 20 heterozygous. The control group presented 24 homozygous for Methionine, 3 homozygous for valine and 15 heterozygous. There was no significant difference between groups. None of the samples from 61 patients and 75 controls presented the E200K mutation. Our data corroborate other groups studies showing that the codon 129 have no significant association with AD. The general low frequency of the E200K mutation may explain the absence of this variant in our sample, which must be confirmed with larger cohorts, with particular attention for possible stratification due to ethnicity and other important factors or even due to cosegregation with other genes linked to PRNP. Whole sequencing for PRNP gene will be necessary to clarify additional involvement of this marker and AD. This work contributed to a better understanding of the local population profile and increase more data for frequency of the polymorphism of codon 129 at PRNP gene in Brazilian population.

Key Words: ALZHEIMER; DISEASE PRION; PRION; DISEASE; POLYMORPHISM; BRAZIL.

Sumário

Prefácio	4
Agradecimentos	5
Resumo	7
Abstract	8
1. Introdução	10
1.1 Novo perfil epidemiológico e Demências	10
1.2 Doença de Alzheimer	11
1.2.1 Genética da Doença de Alzheimer	12
1.3 Príon	13
1.3.1 Doenças Priônicas	16
1.3.2 Variações genéticas do PRNP	17
1.3.3 Príon e Doença de Alzheimer	18
2. Justificativas	19
3. Objetivos	19
3.1 Gerais	19
3.2 Específicos	20
4. Metodologia	20
5. Resultados	23
6. Discussão	25
7. Conclusão	27
8. Referências Bibliográficas	29
9. Anexo I	

Tabela 4 – Frequência genotípica e alélica do codon 129 do PRNP em diversas populações humanas.

10. Anexo II

Punding as a transient symptom in a patient with an early onset form of Dementia

11. Anexo III

Resumos do 57º Congresso Brasileiro de Genética

12. Anexo IV

Produção acadêmica: Exaggerated blood pressure response during exercise treadmill testing: functional and hemodynamic features, and risk factors

1. Introdução

1.1. Novo perfil epidemiológico e Demências

Ao longo do processo de evolução das populações humanas, vários fatores contribuíram para o aparecimento e reconhecimento de diversas doenças. A Revolução Agrícola, no período do Neolítico, permitiu aos agrupamentos tribais mais complexos e numerosos, o aumento das doenças nutricionais, infectocontagiosas, zoonoses e parasitárias, caracterizando, assim, a primeira transição epidemiológica¹.

Os aprimoramentos na saúde pública, principalmente durante os séculos XIX e XXI, proporcionaram declínio de várias doenças infecciosas, especialmente com o advento das vacinas, melhorias na higiene pessoal e do sanitarismo^{1,2}. Esses benefícios se refletiram na queda da mortalidade e no aumento significativo da expectativa média de vida, passando de 58 anos, entre 1970 e 1975, para 67 anos entre 2005 e 2010, segundo a Organização das Nações Unidas. Em países mais desenvolvidos esse índice chega, atualmente, a 77 anos³.

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a expectativa de vida da população brasileira era de 71.3 anos em 2003, sendo a 86ª maior expectativa de vida no mundo, de acordo com a Organização das Nações Unidas⁴.

Esse novo perfil demográfico e melhorias em alguns parâmetros de saúde pública pavimentaram a segunda transição epidemiológica que se caracteriza, entre outros fatores, pelo aumento dos casos de câncer, demências diversas e coronariopatias⁵.

A idade continua sendo o maior fator de risco, em especial nas doenças demenciais, como Alzheimer, Parkinson, Huntington, Doenças Priônicas, entre outras, afetando frequentemente adultos tardiamente. A maior parte dos casos são esporádicos (sem fonte conhecida de contágio ou mutações genéticas), mas fatores genéticos e iatrogênicos são reportados para boa parte dessas doenças^{6,7}.

A demência é clinicamente caracterizada pelo declínio de múltiplas funções cognitivas, tais como memória, praxia e linguagem. Dependendo da etiologia e do grau de comprometimento, a demência pode ter seu quadro revertido⁸.

As demências podem ser ocasionadas por vários fatores, tais como síndromes metabólicas (Síndrome de Cushing.); Intoxicação (Demência Alcoólica e outras drogas psicóticas.); doenças neurodegenerativas (Doença de Alzheimer (DA), Doença de Pick, Demência por corpos de Lewy); ou doenças infecciosas (AIDS, Neurosífilis, Doença de Creutzfeldt-Jakob (DCJ))⁹.

A incidência dessas doenças demenciais é de 1,5% ao ano na população na faixa etária em torno de 60 anos. Este índice pode chegar a 30% na população acima dos 80 anos. É menos frequente em homens e em populações africanas e asiáticas. As causas dessas doenças também variam conforme as populações, sendo a Doença de Alzheimer mais comum na europeia e a Demência Vascular mais incidente na China¹⁰.

1.2. Doença de Alzheimer

Em novembro de 1906, Alois Alzheimer apresentou ao mundo o caso da paciente Auguste D na 37ª Conferência da *South-West German Psychiatrists*. A paciente em questão, com 51 anos, apresentava disfunção cognitiva progressiva, alucinações, entre outros sintomas. Apenas no ano seguinte, com o trabalho intitulado “*A characteristic serious disease of the cerebral cortex*” ele descreveu histopatologicamente o caso de Auguste D¹¹.

A DA corresponde a pelo menos metade dos casos de demência no mundo, com incidência estimada em 4.4% em pessoas com 65 anos de idade e de 22% aos 90 anos. A idade e histórico familiar positivos são os dois maiores fatores de risco¹².

Atualmente, de acordo com o Código Internacional de Doenças - 10 (CID-10), a DA é classificada como doença neurodegenerativa primária, com etiologia ainda desconhecida. Tem caráter progressivo, com curso clínico que pode variar de poucos anos (2 a 4) até décadas. De acordo com a idade de início da doença, pode ser subdividida em forma precoce (*Early Onset Alzheimer's Disease – EOAD*), antes dos 65 anos, ou em forma tardia (*Late Onset Alzheimer's Disease – LOAD*), mais incidente que acomete pessoas acima dos 65 anos¹³.

Para o diagnóstico definitivo para a DA, o paciente deve preencher alguns critérios tais como ter demência, desde que não se tenha evidência de ser causada por deficiência em vitamina B12, Niacina, presença de neurosílis ou outras fontes conhecidas; início insidioso de lenta progressão; e ausência de início súbito, provocado por lesões focais, por exemplo. Para o diagnóstico diferencial, devem-se considerar transtornos depressivos; *delirium*; demência vascular; outras demências primárias como a frontotemporal (doença de Pick) e DCJ¹³.

Na década de 80 do século passado, foi criado um grupo com o intuito de estabelecer critério universal e assim caracterizar clinicamente a DA. Em princípio, a essa doença se caracterizava pela presença de demência, avaliada com testes padronizados, como o *Mini Mental State Examination (MMSE)*; prejuízo da memória e outras funções cognitivas como linguagem, percepção, aparecer em idade entre 40 a 90 anos; entre outros fatores¹⁴.

Vale ressaltar que a DA é heterogênea, o que dificulta uma avaliação no início da doença. Além disso, podemos encontrar sintomas pontuais em alguns pacientes, o que foi debatido no artigo gerado a partir da análise clínica de um dos nossos pacientes do HC-UFPE. Este trabalho encontra-se no anexo II.

Entretanto, como ressalta o neurologista Ricardo Nitrini, algumas peculiaridades do nosso país fazem com que alguns exames e testes para avaliar o quadro suspeito de DA devem ser analisados de forma adaptada de acordo com nossa realidade, principalmente por conta das diferenças na escolaridade¹⁵.

1.2.1. Genética da Doença de Alzheimer

Durante os últimos 15 anos, diversos trabalhos foram feitos sobre a DA, principalmente em busca de marcadores genéticos. O banco de dados Alzgene (www.alzgene.org) foi criado para facilitar a análise desse montante de dados, disponibilizando em seu site mais de 300 polimorfismos em diversos genes, mas apenas alguns confirmados - de forma independente¹⁶.

A forma EOAD corresponde a cerca de 10% dos casos de DA, possui herança autossômica dominante e algumas mutações se destacam em três

genes: proteína precursora amilóide (APP), presenilina-1 (PSEN-1) e presenilina-2 (PSEN-2), localizados nos cromossomos 21, 14 e 1 respectivamente¹⁷.

A forma tardia é mais complexa, com herança multifatorial sendo influenciada por componentes genéticos e ambientais. O principal fator de risco é o alelo $\epsilon 4$ da Apolipoproteína E (APOE), localizado no cromossomo- 19¹⁸. O gene da APOE possui três isoformas: $\epsilon 2$; $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$. Enquanto que a isoforma $\epsilon 2$ agiria como um fator de proteção, a $\epsilon 4$ estaria envolvida na formação das placas senis desencadeando o processo neurodegenerativo GEORGE-HYSLOP¹⁸.

Oliveira *et al.* reportou os principais fatores de risco na população brasileira, reunindo dados de estudos de ligação e caso-controle. Além dos polimorfismos já descritos, outros foram estudados e estão ilustrados na tabela abaixo¹⁶.

Tabela1. Resumo dos estudos de associação caso-controle na população Brasileira

Referência	Polimorfismos	Nível de significância	Tamanho da amostra
Oliveira et al. (1997)	ApoE- $\epsilon 4$	P < 0,05	57
Oliveira et al. (1998)	5-HTTLPR	P < 0,05	81
Nishimura et al. (2000)	DXS1047	P > 0,05	130
Nishimura et al. (2001)	D10S1423	P > 0,05	130
Nishimura et al. (2004)	BDNF (C-270T)	P > 0,05	188
	BDNF (C-270T) + ApoE- $\epsilon 4$	P < 0,05	
	MAOA	P > 0,05	
Nishimura et al. (2005)	MAOA + ApoE- $\epsilon 4$ +	P < 0,05	128
	5-HTTLPR		
	IL-1 α and IL-1 β		
Dados não publicados	ApoE- $\epsilon 4$	P < 0,05	195
Fernandez et al. (2005)	MTHFR (C-677T)	P > 0,05	30
	ApoE- $\epsilon 4$	P < 0,05	
da Silva et al. (2006)	M HFR (C-677T)/(A-1298C)	P > 0,05	43

1.3. Príon

Comumente se refere à proteína príon para designar o “agente etiológico” das Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (EET). Entretanto, a príon possui duas isoformas, sendo apenas uma delas patogênica e denominada *príon*

scrapie (PrP^{Sc}). A outra, denominada *prion* celular (PrP^{C}) é encontrada normalmente em vertebrados e algumas “*prions like*” em leveduras^{19,20,21}.

A PrP^{C} possui 3 α -hélices na região globular (correspondente aos resíduos 144-154; 173-194; 200-228) e duas folhas β -antiparalelas (128-131 e 161-164). Pode ser encontrada de forma não glicosilada, monoglicosilada ou diglicosilada, ocorrendo nos aminoácidos de asparagina (181 e 197); Possui uma ponte de disulfeto entre os aminoácidos de cisteína (179 e 214). A figura 1 abaixo representa a estrutura terciária da PrP^{C} e as principais mutações associadas às doenças priônicas.

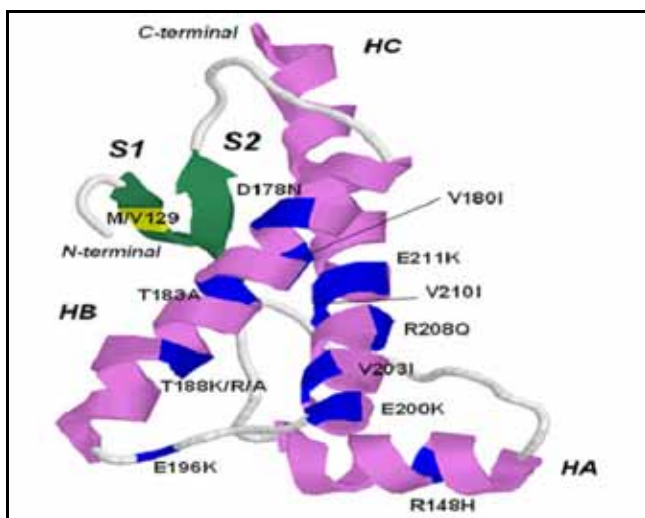


Figura 1 – Estrutura tridimensional da PrP^{C} mostrando as principais mutações associadas às doenças priônicas. HC- Porção hidrofóbica. H^A - H^C – formação em α – hélice. S1 e S2 – formação em folhas β -pregueadas. S-S – Ponte de disulfeto. (figura retirada de Capellari *et al*²². Uso da imagem autorizado pela revista: License Number – 2833820137731).

Apesar de ainda não ser totalmente conhecida, sabe-se que a PrP^{C} participa de diversos eventos celulares que são desde regulação, direta ou indireta, da apoptose, sinalização celular, proteção neuronal e tendo uma forte evidência do controle do estresse oxidativo²³.

A PrP^{C} é sintetizada a partir do gene PRNP, que em humanos está localizado no braço curto do cromossomo 20, com 16 kb e 2 éxons. A ORF (*open reading frame*) está localizada no segundo éxon e codifica uma proteína de 253 aminoácidos. Na figura 2 abaixo, vemos uma representação esquemática do gene PRNP evidenciando as principais mutações associadas às doenças priônicas²².

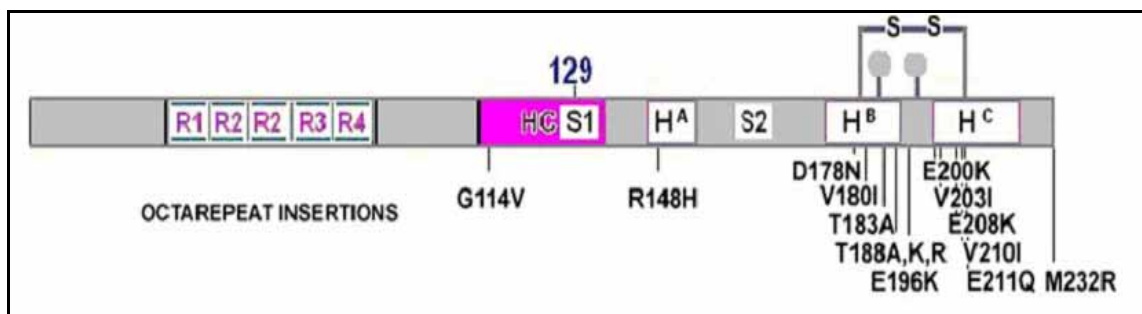


Figura 2 – Esquema do gene PRNP evidenciando as principais mutações associadas às doenças priônicas. R1 a R4 representa mutações do tipo inserção deleção OPR. HC- Porção hidrofóbica. H^A - H^C – formação em α – hélice. S1 e S2 – formação em folhas β -pregueadas. S-S – Ponte de dissulfeto. Círculos cinzas – sítios de glicosilação. (figura retirada de Capellari *et al*²². Uso da imagem autorizado pela revista: License Number – 2833820137731).

Diferente da PrP^C, a PrP^{Sc} é insolúvel, resistente a proteases e diversos detergentes, além das altas temperaturas, tendendo a formar fibrilas naturalmente, sendo ricas em folhas β -pregueadas. Apesar de quase não haver dúvidas sobre a relação da PrP^{Sc} com as doenças priônicas, a forma de “conversão” da forma fisiológica para a patogênica ainda é o grande desafio na biologia da prion²⁴.

Para Stanley B. Prusiner, essa conversão se daria através de evento da habilidade da PrP^{Sc} induzir a mudança estrutural da PrP^C através de interações bioquímicas. Outros autores sugerem que a interação da PrP^C com outra proteína, “*proteína x*” resultaria em um composto instável que acabaria transformando a PrP^C em PrP^{Sc}, desfazendo a interação com a proteína x^{25,26}.

Outros grupos, inclusive da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), liderada pelo pesquisador Jerson L. Silva postula que essa mudança se daria da interação da PrP^C com ácidos nucleicos, possivelmente com o RNA e essa interação, através de mudanças na entropia da PrP^C ocasionaria na alteração estrutural. Apesar desses estudos, ainda não há um consenso de como se dá essa mudança, sendo um dos principais desafios na biologia da prion^{27,26}.

1.3.1. Doenças Priônicas

As Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (EET) ou doenças priônicas, formam um grupo único de doenças que podem ser esporádicas, genéticas ou adquiridas, e possuem um amplo espectro fenotípico, guardando em comum o aspecto espongiforme do tecido nervoso e depósito extracelular da PrP^{sc} observado na figura 3 abaixo²⁸.

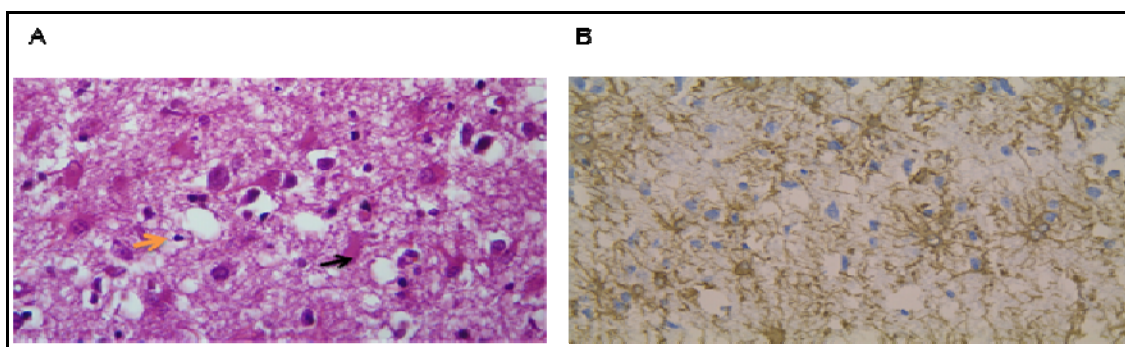


Figura 3 – A: Corte histológico do córtex frontal de um paciente com Doença de Creutzfeldt-Jakob (DCJ) evidenciado o aspecto espongiforme do tecido nervoso. A seta mais clara aponta para um neurônio atrofiado enquanto que a seta preta mostra uma célula da glia. **B:** Imunohistoquímica com anticorpo anti-PrP^{sc} mostrando um intenso depósito protéico.

Dentre as principais EET podemos citar: Doença Crônica Debilitante do Cervídeo (CWD); Encefalopatia Espongiforme Bovina – “*mal da vaca louca*”, em bovinos (BSE); *Scrapie*, em ovelhas e cabras; Doença de Creutzfeldt-Jakob (DCJ), Doença de Gerstmann-Straüssler-Scheinker (GSS), Insônia Fatal (IF) e Kuru em humanos²⁹.

A doença de Creutzfeldt-Jakob (DCJ) apesar de rara, é a doença priônica mais frequente, sendo descrita em diversos países, inclusive no Brasil. No entanto, são escassas as informações no país sobre esta doença e, em publicação recente, foi contestada a atual política de vigilância epidemiológica para doença priônica excessivamente voltada para poucos centros que realizam as técnicas necessárias para a adequada confirmação dos casos suspeitos³⁰.

A DCJ possui incidência de 1 caso a cada 1 milhão de habitantes, afeta homens e mulheres na mesma proporção e ocorre na faixa dos 55 a 65 anos. É causada pelo acúmulo da prion *scrapie* nos neurônios. Pode ser adquirida, genética ou esporádica, sendo a última a forma mais prevalente, aproximadamente 85% dos casos³¹.

Clinicamente, a DCJ é caracterizada por demência progressiva com duração menor que dois anos, mioclonias, ataxia e outros sintomas. O diagnóstico é feito associando o quadro clínico seguido de exames de ressonância magnética (RM), eletroencefalograma (EEG) e pesquisa no líquido da proteína 14-3-3.

Entretanto, na prática clínica reconhecer pacientes com DCJ requer muito cuidado e habilidade do médico, visto que os sinais e achados de exames para a DCJ se confundem com outras doenças neurológicas. Por esta razão, Michael Geschwind da Universidade de São Francisco, Califórnia, a chama de “*great mimicker*” o que pode ser ilustrado no exemplo do próprio Creutzfeldt que, segundo o mesmo, seus casos nada tinham em comum com os casos de Jakob, e até mesmo alguns dos primeiros casos de Jakob não seriam hoje classificados como DCJ³².

Acredita-se que essa semelhança com outras doenças não seja apenas coincidência e até se levanta a hipótese de que a príon participe direta ou indiretamente da patogenia de outras doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson³³.

1.3.2. Variações genéticas da PRNP

Mais de 20 mutações no PRNP já foram descritas em diversas populações, sendo P102L, D178N, E200K, e V210I as mais comuns, além do polimorfismo do códon 129 (M129V), sendo este último o mais importante no estudo das EET, modulando diversos aspectos, tais como tempo de incubação e outros aspectos clínicos³⁴.

O polimorfismo do códon 129 resulta no resíduo de aminoácido metionina (selvagem) ou valina (mutante). A frequência alélica, na população saudável, varia entre as diversas populações humanas, podendo ser de 0.653 na população britânica a 0, 958 na Japonesa para o alelo M. A tabela 2 abaixo mostra as frequências deste polimorfismo em vários grupos étnicos. No anexo 1, encontra-se a tabela completa do NCBI³⁵.

Tabela 2 - Frequência genotípica para o códon 129 do PRNP em algumas populações humanas.

População	Grupo Étnico	Cromossomos (N)	MM	MV	VV	M	V
CEPH		184				0.560	0.440
HapMap-CEU	Européia	120	0.433	0.433	0.133	0.650	0.350
HapMap-HCB	Asiática	90	0.933	0.067		0.967	0.033
HapMap-YRI	Áfricana	120	0.400	0.517	0.083	0.658	0.342
HapMap-CEU	Européia	226	0.442	0.425	0.133	0.655	0.345
HapMap-HCB	Asiática	86	0.930	0.070		0.965	0.035

No Brasil, três trabalhos mostram a distribuição alélica e genotípica do códon 129 na população brasileira e mostram uma maior frequência do alelo M, condizente com dados de demais populações mundiais. Já a mutação E200K (rs28933385) é mais frequente na forma genética da DCJ, principalmente em famílias judaicas, com relatos desta em artigo recente no Brasil^{36,37}.

1.3.3. Príon e Doença de Alzheimer

A príon vem sendo estudada por diversos grupos não apenas em doenças priônicas, mas também em outras desordens neurológicas e sistêmicas. Alguns grupos mostram que diferenças na expressão do PRNP podem levar a sérias consequências, tais como formas mais agressiva do câncer, além de ser um potencial marcador na terapia do câncer colo-retal^{38,39}.

Além disso, o polimorfismo códon 129 é o mais estudado em desordens não priônicas como fator de risco, principalmente na DA. Entretanto, os resultados encontrados são conflitantes, possivelmente devido à heterogeneidade das populações estudadas^{40,41,42}.

Infelizmente, pouco se sabe da frequência alélica e genotípica do códon 129, o que dificulta os estudos tanto para a DCJ quanto para outras desordens que possam estar associadas a esse polimorfismo. Apenas o trabalho de De Paula *et al.* foi realizado nesse sentido e mostrou que temos uma distribuição alélica semelhante a povos europeus e asiáticos⁴³.

Este trabalho teve como principais finalidades a observação da frequência do códon 129 e 200 em amostras da população brasileira. Apesar da mutação

E200K ser a mais frequente na DCJ, principalmente em famílias judaicas, essa nunca foi descrita em pacientes com doença de Alzheimer em estudos prévios. Entretanto, poucos estudos no Brasil foram feitos com o PRNP, mesmo para as doenças priônicas.

2. Justificativa

Este tipo de estudo é de grande importância, principalmente se considerarmos o aumento progressivo e contínuo da incidência deste transtorno neuropsiquiátrico em todo o mundo, inclusive no Brasil, onde coincidentemente são realizadas relativamente poucas pesquisas sobre o tema. Além disso, a análise desenvolvida neste projeto poderá auxiliar tanto na definição de métodos diagnósticos mais rápidos e eficazes como na melhor compreensão da DA, abrindo novas perspectivas para o diagnóstico e tratamento, principalmente se considerando as atuais evidências que sugerem a sobreposição da DA e a DCJ.

3. Objetivos

3.1.1. Geral

- Mostrar a distribuição do códon 129 e E200K do gene PRNP na população estudada e comparar com dados obtidos previamente no Brasil e em outros países.

3.1.2. Específico

- Investigar a possível associação dos polimorfismos do códon M129V e E200K do PRNP com a Doença de Alzheimer.

4. Metodologia

Foram utilizadas 145 amostras de DNA de pacientes com DA provável ou possível, diagnosticados clinicamente, e 205 controles, sendo 63 oriundos de coletas realizadas em Pernambuco (PE) e 82 do Espírito Santo (ES). 20 amostras controles eram provenientes de PE e as demais do ES¹⁴.

Para a genotipagem do PRNP foram utilizados dois pares de primers que cobriam todo o quadro de leitura do gene. Os pares foram os seguintes: primeiro par Fw1 - 5'-CTGACGTTCTCCTCTTCATTTTG-3' e Rv1 - 5'-CTCATGGCACTTCCCAGCATGTA-3' e o segundo par Fw2 - 5'-AACCAACATGAAGCACATGG-3' e Rv2 - 5'-TCCCTCAAGCTGGAAAAAGA-3'.

Devido a dificuldades técnicas com o sequenciador MegaBace 1000 (Sunnyvale, CA), apenas 19 amostras de pacientes foram sequenciadas, 11 para o primeiro par e 8 para o segundo, utilizado o kit DYEnamic ET terminator® (Amersham Pharmacia Biotech, Inc, USA) para a reação de seqüenciamento, sendo estas realizadas segundo as especificações do fabricante. A figura abaixo ilustra dois eletroferogramas para o códon 129 e 200 do PRNP.

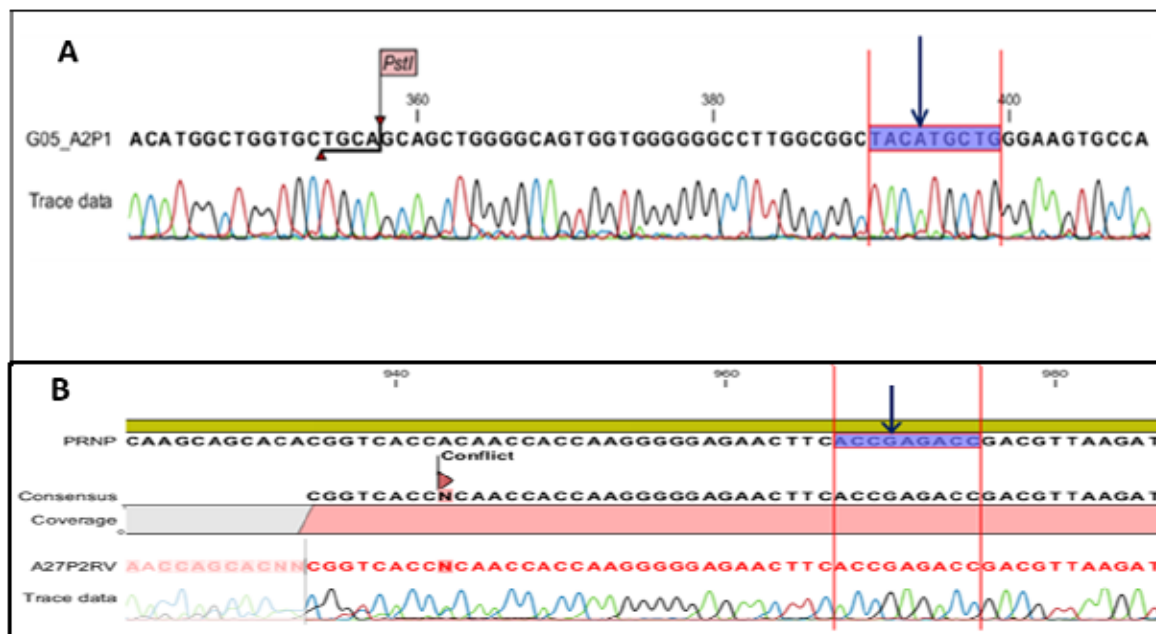


Figura 4 – A: Sequenciamento de um paciente com DA. A seta azul indica o ponto do polimorfismo do códon 129 para o PRNP, mostrando um indivíduo homozigoto para metionina. B: sequenciamento do primer 2 para o códon 200 do PRNP. A seta azul indica que o indivíduo não possui a mutação.

Devido a estas importantes dificuldades, mudamos a abordagem para o uso de duas enzimas de restrição para genotipar o códon 129 e 200. Para tal, usamos o Primer Fw1 e o Rv2 utilizando a ciclagem: 95° por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de 95° por 30 segundos; 60° por 30 segundos; 72° durante 1 minuto e extensão final de 72° por 5 minutos. O DNA estava em uma concentração de 30ng, amplificando um produto com 850 pares de base (pb) que contempla ambos os códons. A figura abaixo mostra um segmento deste produto, mostrando os sítios de restrição das duas enzimas, mantendo a contagem original das bases.

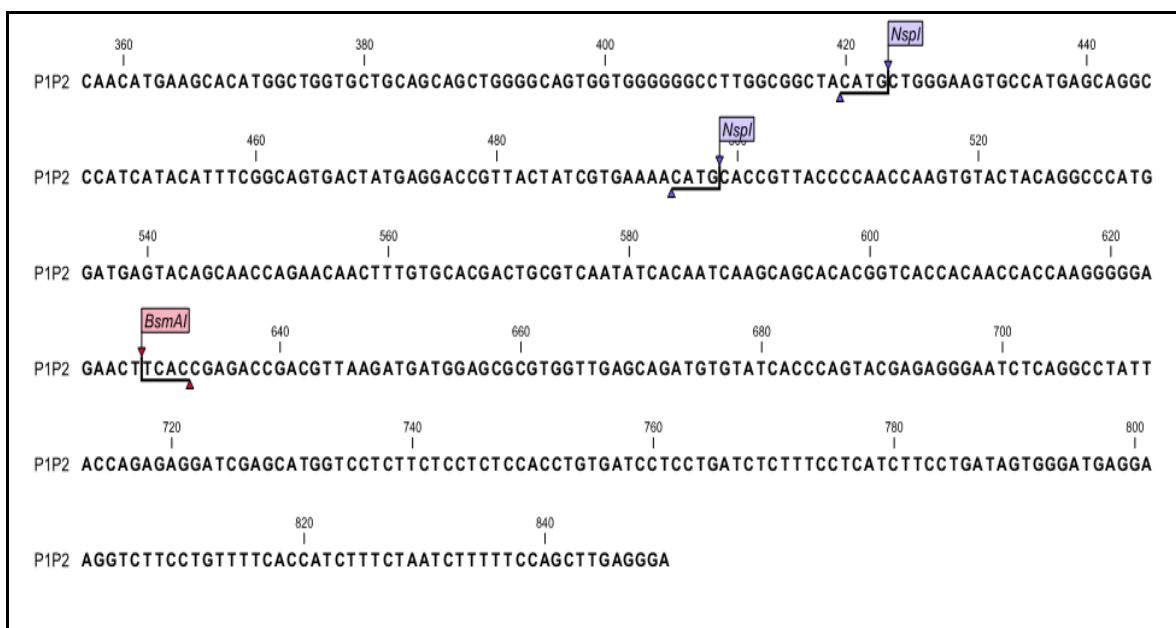


Figura 5 – Fragmento do produto de PCR evidenciado os dois sítios de restrição para a enzima NspI (códon 129 do gene PRNP) e um sítio para a BsmAI (códon 200 do gene PRNP)

Para o códon 129, foram utilizados 10µl do produto de PCR com 10 unidades de enzima com tampões e concentrações indicadas pelo fabricante. Em seguida, as amostras foram separadas por eletroforese em gel de agarose a 1,5% corados com brometo de etídio. Em indivíduos homozigotos para metionina observamos os fragmentos de banda de 423, 352 e 75 pb; Indivíduos heterozigotos apresentavam as bandas de 498, 423, 352 e 75 pb enquanto que homozigotos valina apresentavam as bandas 498 e 352 pb.

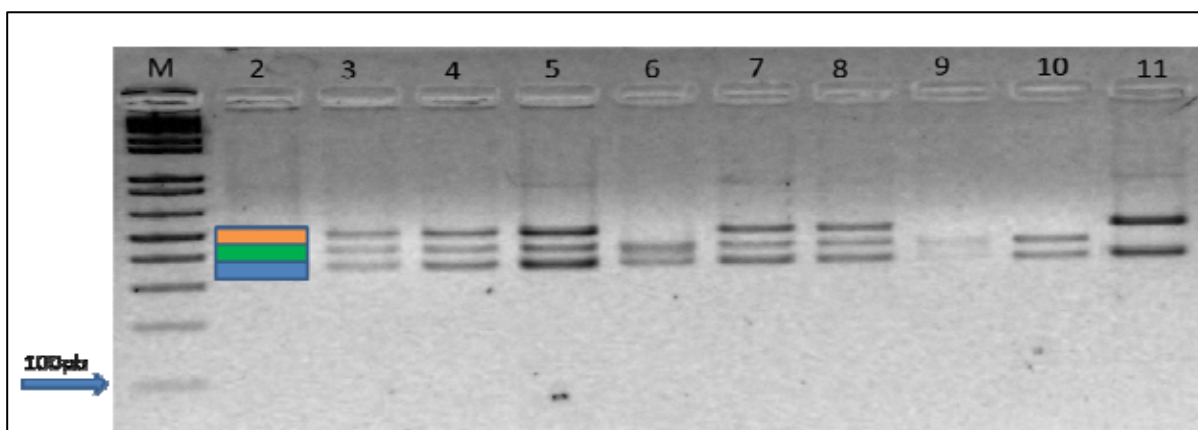


Figura 6 - Imagem de uma corrida de eletroforese em gel de agarose a 1,5% da digestão com NspI mostrando os padrões de bandas para os genótipos MM (6,9 e 10), MV (2,3,4,5,7 e 8) e VV (11). Os retângulos laranja, verde e azul representam as bandas de 498, 423 e 352 pb, respectivamente. M = *ladder* marcador de peso molecular.

O mesmo foi feito para o códon 200, usando a enzima BsmAI (Biolabs), mas agora utilizando gel de agarose a 1%. A enzima reconhece um sítio de restrição apenas em indivíduos sem a mutação, resultando em dois fragmentos de 628 e 222 pb.

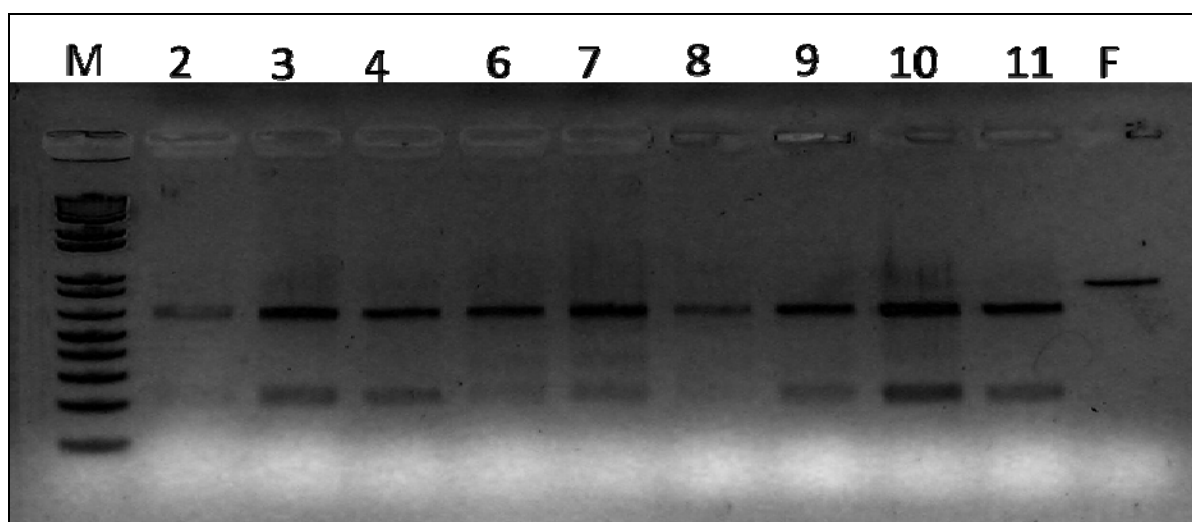


Figura 7 - Imagem de uma corrida de eletroforese em gel de agarose a 1% da digestão com BsmAI. 2 a 11 representam amostras de pacientes com DA sem a mutação E200K apresentando as bandas de 628 e 222 pb. M = *ladder*; F = fragmento sem ser digerido.

De posse das frequências alélicas e genóticas das nossas amostras, comparamos com dados publicados em trabalho recente de Smid *et al* (2011) que fez o mesmo trabalho que o nosso, mas varrendo todo o PRNP e com amostras unicamente de SP além de dados publicados no Alzgene.

Além disso, comparamos os nossos controles com dados previamente publicados por de Paula *et al* (2005) e do artigo de Beck *et al*. (2010).

5. Resultados

Das 145 amostras de pacientes e 205 controles, 42 amostras de cada grupo foram genotipadas para o códon 129 do PRNP. As duas populações respeitam o equilíbrio de Hardy-Weinberg, com $p = 0,95$ nos pacientes com DA e $p=0,75$ nos controles para os genótipos do códon 129 do PRNP. Já para o códon 200, deste mesmo gene, 61 pacientes e 75 controles foram genotipados, não sendo encontrada nenhuma amostra com a mutação. Na tabela 3 abaixo vemos a distribuição genotípica do códon 129 e 200 de pacientes com DA e controles.

Tabela 3 – Distribuição genotípica dos códons 129 e 200 do PRNP nos pacientes com DA e controles. Números entre parênteses representam valores percentuais aproximados.

Códon	Genótipo	DA (%)	Controles (%)	P
129	MM	16 (38,1)	24 (57,1)	0,187*
	MV	20 (47,7)	15 (35,7)	
	VV	6 (14,2)	3 (7,2)	
200	EE	61 (100,0)	75 (100,0)	-
	EK	0	0	
	KK	0	0	

DA = doença de Alzheimer; M = metionina; V = valina; p = valor de p; * = teste G

A frequência dos alelos M e V também não mostraram diferença significativa entre os pacientes com DA e controles. No primeiro grupo, a frequência foi de 0,62 e 0,38 para os alelos M e V, respectivamente e nos controles de 0,75 e 0,25.

Ao comparar nossos dados com os de Smid, também não observamos diferença significativa entre pacientes com DA e controles. A tabela abaixo mostra a distribuição dos genótipos para o códon 129 do PRNP tanto do nosso trabalho quanto os de Smid⁴⁴.

As frequências alélicas de M e V deste trabalho comparado com o de Smid também não tiveram diferença significativa, com $p = 0,57$.

Tabela 4 - Comparação genotípica do códon 129 do PRNP entre dados deste trabalho com resultados de Smid (2011).

Genótipo		DA (%)	p	Controles (%)	P
Gomes da Cunha (2012)	MM	16 (38,1)	0,72*	24 (57,1)	0,15*
	MV	20 (47,7)		15 (35,7)	
	VV	6 (14,2)		3 (7,2)	
Smid (2011)	MM	45 (45,5)		44 (39,6)	
	MV	42 (42,4)		56 (50,5)	
	VV	12 (12,3)		11 (9,9)	

DA = doença de Alzheimer; M = metionina; V = valina; p = valor de p; * = teste G

O trabalho apresentado por Smid também não mostrou a presença da mutação E200K associada nem com pacientes com DA nem com amostras controles.

As distribuições genotípica e alélica dos controles deste trabalho comparado com resultados do estudo de De Paula *et al* (2005) também não mostrou diferença significativa com $p = 0,34$ para os genótipos e $p = 0,14$ para os alelos.

6. Discussão

Neste presente estudo, não foi detectada a mutação E200K em amostras de pacientes nem nos controles. Apesar de ser a mutação mais frequente na DCJ familiar, com casos descritos no Brasil, esta não foi relatada em pacientes com DA até o presente momento, provavelmente devido a sua baixa frequência ou mesmo por talvez apresentar associação restrita na não DA³⁷.

Não houve diferença significativa entre pacientes com DA e controles para o códon 129 do PRNP, o que já foi relatado em alguns outros trabalhos. A tabela abaixo mostra o resumo de alguns trabalhos disponíveis no banco de dado do Alzgene em que podemos observar que a maior parte deles não aponta influência deste polimorfismo com a DA.

Tabela 5 - Resumo dos estudos publicados que analisaram a influência do códon 129 do PRNP em diversas populações (Modificado do Alzgene, www.alzgene.org).

Estudo	População	DA (N)	Controles (N)	Resultado
<u>Casadei, 2001</u>	Itália	212	201	Tendência
<u>Combarros, 2000</u>	Espanha	278	268	Negativo
<u>Cousin, 2009</u>	França	428	475	Negativo
<u>Del Bo, 2005</u>	Itália	258	318	Negativo
<u>Dermaut, 2003</u>	Holanda	123	282	Positivo
<u>Gacia, 2006</u>	Polônia	166	194	Positivo
<u>Golanska, 2009</u>	Polônia	213	171	Positivo
<u>Li, 2005</u>	EUA	281	415	Negativo
<u>Li, 2008</u>	Canadá	753	736	Tendência
<u>Poleggi, 2008</u>	Itália	195	124	Negativo
<u>Poleggi, 2008</u>	EUA	109	58	Negativo
<u>Reiman, 2007</u>	EUA, Holanda	861	550	Negativo
<u>Riemenschneider, 2004</u>	Alemanha	482	911	Positivo
<u>Ahn, 2006</u>	Coréia	297	217	Negativo
<u>Jeong, 2007</u>	Coréia	271	236	Negativo
<u>Jeong, 2009</u>	Coréia	152	268	Negativo
<u>Ohkubo, 2003</u>	Japão	548	466	Negativo

Nossos dados mostram frequências alélicas e genóticas semelhantes as já descritas para a população brasileira nos trabalhos de Smid, Martins *et al.* (2007) e de Paula *et al* (2005)^{36, 44, 43}.

Considerando que as amostras de indivíduos saudáveis dos trabalhos de De Paula *et al*, Vilma *et al* e Smid possuem são amostras distintas, pelo que descrevem suas metodologias, bem como as nossas, temos um *pool* de 546 amostras com a distribuição genotípica de 49,1% para indivíduos MM; 44,7 indivíduos MV e 6,2% indivíduos VV. O que nos mostra um perfil molecular semelhante aos descritos em populações européias, mas diferente das asiáticas.

Por conta da falta dos dados epidemiológicos das amostras, tais como idade média dos primeiros sintomas, proporção de homens e mulheres além de outros dados genéticos, não efetuamos mais análises para comparar a influência conjunta do PRNP com outros fatores de risco, como as formas EOAD e LOAD, bem como o alelo $\epsilon 4$ da APOE⁴⁵.

Apesar de nossos resultados não apontarem para uma associação do códon 129 do gene PRNP como fator de risco para a DA, o ampliamiento de estudos mostrando a distribuição genotípica e alélica deste polimorfismo é de suma importância devido a sua associação como fator de risco para as doenças

prionicas ainda pouco conhecida no Brasil por fatores já discutidos por nosso grupo³⁰.

Além disto, esse mesmo polimorfismo já foi relacionado a outras desordens, tendo influência no curso clínico de algumas doenças, como a de Wilson, algumas formas de Parkinson entre outras⁴⁴.

Entretanto, tanto nossos controles quanto os dos outros artigos possuem distribuição genotípica e alélica diferente do que é apresentado no artigo de Beck *et al.*, que mostra uma frequência do alelo V maior do que do alelo M³⁴.

Esta diferença encontrada em Beck *et al.* pode estar relacionada com o perfil das populações usadas neste artigo, que se trata de dois grupos indígenas (Suruí (Paiter) e Karitiana) um número pequeno das duas populações estudadas³⁴.

7. Conclusão

Os dados apresentados neste trabalho não mostraram uma diferença estatística significativa entre as frequências genotípicas e alélicas do códon 129 do PRNP entre os pacientes com DA e controles. Estes dados corroboram com outros autores, inclusive um recente trabalho em que foi investigado esse polimorfismo na população brasileira.

Essa ausência na associação de risco do códon 129 do PRNP na população brasileira pode estar associada a diferenças étnicas da nossa população bem como outros fatores de risco genético associados à DA.

Entretanto, nossos resultados mostraram que a distribuição alélica e genotípica da variação em questão se dá de forma semelhante a diversas populações mundiais, principalmente européias o que é condizente com a história de colonização do nosso país.

Ao se comparar nossos dados com outros em que foram feitas análises semelhantes na população brasileira, não observamos diferença significativa, o que mostra que a nossa amostra é representativa da população brasileira.

Por fim, não houve o relato da mutação E200K nem em indivíduos com DA nem dos controles o que pode ser explicado pela sua baixa frequência na

população mundial além do fato desta poder ter apenas uma relação com as doenças priônicas.

Para reforçar nossos resultados, iremos dar sequência com as demais amostras que temos, tanto de pacientes com DA quanto de controles, para ter uma melhor conclusão desses resultados. Além disso, uma abordagem epidemiológica será adicionada aos resultados moleculares para ver se há diferença ao estratificarmos a nossa amostra.

Nosso estudo serviu para delimitar melhor o perfil molecular da população brasileira para o códon 129 do PRNP, o que é de grande relevância para estudos de doenças priônicas que ainda é muito negligenciada no Brasil, bem como contribui para ampliação do debate deste polimorfismo como fator de risco para a DA.

8. Referências Bibliográficas

1. Armelagos, G.J., Barnes, K.C. & Lin, J. Disease in human evolution: the re-emergence of infectious disease in the third epidemiological transition. *National Museum of Natural History Bulletin for Teachers* **18**, 1-6 (1996).
2. Rodrigues, S.P. As Contribuições de Galtier e Pasteur para a Teoria Microbiana Das Doenças The Contributions of Galtier and Pasteur to the Microbian Theory of Disease. *IV Simpósio Nacional de Tecnologia e Sociedade* (2011).at <<http://www.esocite.org.br/eventos/tecsoc2011/cd-anais/arquivos/pdfs/artigos/gt002-ascontribuicoes.pdf>>
3. Affairs, D. of E. and S. & Population World Population Prospects: The 2006 Revision, Highlights. *ONU* (2007).at <<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:World+Population+Prospects+The+2006+Revision+Highlights#0>>
4. IBGE Tábuas Completas de Mortalidade 2003. (2004).at <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=266>
5. Revolution, T.T. *The Third Revolution : The Convergence of the Life Sciences , Physical Sciences , and Engineering. Engineering*
6. Tsuji, S. Genetics of neurodegenerative diseases: insights from high-throughput resequencing. *Human molecular genetics* **19**, R65-70 (2010).
7. Johnson, R.T. Prion diseases. *Lancet neurology* **4**, 635-42 (2005).
8. J, Sadock, B. & Sadock, V.A. *Compêndio de Psiquiatria Ciência do Comportamento e Psiquiatria Clínica*. 750 (Artmed: 2007).
9. Knopman, D.S., Boeve, B.F. & Petersen, R.C. Essentials of the proper diagnoses of mild cognitive impairment, dementia, and major subtypes of dementia. *Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic* **78**, 1290-308 (2003).
10. Ritchie, K. & Lovestone, S. The dementias. *Lancet* **360**, 1759-66 (2002).
11. Maurer, K., Volk, S., Gerbaldo, H. & others Auguste D and Alzheimer's disease. *Lancet* **349**, 1546–1549 (1997).
12. Bettens, K., Sleegers, K. & Van Broeckhoven, C. Current status on Alzheimer disease molecular genetics: from past, to present, to future. *Human molecular genetics* **19**, R4-R11 (2010).
13. Coord.Mund.da Saúde *Classificação de Transtornos Mentais e de Comportamento da CID-10: Descrições Clínicas e Diretrizes Diagnósticas*. (1993).

14. McKhann, G.M. *et al.* The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* **7**, 263-9 (2011).
15. Nitrini, R. *et al.* DIAGNÓSTICO DE DOENÇA DE ALZHEIMER NO BRASIL CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS E EXAMES COMPLEMENTARES
Recomendações do Departamento Científico de Neurologia Cognitiva e do Envelhecimento da Academia Brasileira de Neurologia. *Current Opinion in Neurology* **63**, 713-719 (2005).
16. Oliveira, J.R.M., Nishimura, a L., Lemos, R.R. & Zatz, M. The genetics of Alzheimer's disease in Brazil: 10 years of analysis in a unique population. *Journal of molecular neuroscience : MN* **37**, 74-9 (2009).
17. Dubois, B. *et al.* Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet neurology* **6**, 734-46 (2007).
18. Hirsch-Reinshagen, V., Burgess, B.L. & Wellington, C.L. Why lipids are important for Alzheimer disease? *Molecular and cellular biochemistry* **326**, 121-9 (2009).
19. Horiuchi, M. & Caughey, B. Prion protein interconversions and the transmissible spongiform encephalopathies. *Structure (London, England : 1993)* **7**, R231-40 (1999).
20. Rongyan, Z., Xianglong, L., Lanhui, L., Xiangyun, L. & Fujun, F. Evolution and differentiation of the prion protein gene (PRNP) among species. *The Journal of heredity* **99**, 647-52 (2008).
21. True, H.L. & Lindquist, S.L. A yeast prion provides a mechanism for genetic variation and phenotypic diversity. *Nature* **407**, 477-83 (2000).
22. Capellari, S., Strammiello, R., Saverioni, D., Kretzschmar, H. & Parchi, P. Genetic Creutzfeldt-Jakob disease and fatal familial insomnia: insights into phenotypic variability and disease pathogenesis. *Acta neuropathologica* **121**, 21-37 (2011).
23. Cammarota, N., Linden, R., Martins, V.R., Prado, M.A.M. & Biofi, I.D. Physiology of the Prion Protein. *Physiological Reviews* 673-728 (2008).doi:10.1152/physrev.00007.2007.
24. Riesner, D. Biochemistry and structure of PrP C and PrP Sc. *British Medical Bulletin* 21-33 (2003).doi:10.1093/bmb/dg66.021
25. Prusiner, S.B. S b. p. *Proc. Natl. Acad* **95**, 13363-13383 (1998).
26. Hachiya, N.S., Imagawa, M. & Kaneko, K. The possible role of protein X, a putative auxiliary factor in pathological prion replication, in regulating a

- physiological endoproteolytic cleavage of cellular prion protein. *Medical hypotheses* **68**, 670-3 (2007).
27. Gomes, M.P.B., Cordeiro, Y. & Silva, J.L. The peculiar interaction between mammalian prion protein and RNA nd es io s ci en ce . D o n o t d i s t r i b u t e La io s ci en ce o r u. *Journal of Molecular Biology* **2**, 64-66 (2008).
 28. Gambetti, P., Kong, Q., Zou, W., Parchi, P. & Chen, S.G. Sporadic and familial CJD : classification and characterisation. *British Medical Bulletin* 213-239 (2003).doi:10.1093/bmb/dg66.213
 29. Johnson, R.T. Prion diseases. *Lancet neurology* **4**, 635-42 (2005).
 30. Gomes da Cunha, J.E. & Oliveira, J.R.M. Compulsory notification of prion diseases in Brazil: What has Changed sinCe 2005? to the editor. *Neuropsychiatry* **2**, 155-156 (2008).
 31. Fábio, M. *et al.* DOENÇA DE CREUTZFELDT-JAKOB A propósito de um caso com comprometimento medular. *Leonardo* **59**, 964-967 (2001).
 32. Creutzfeldt, S. & Jakob, M. It ' s Jakob ' s disease , not Creutzfeldt ' s. *Nature* **393**, 1998 (1998).
 33. Gajdusek, C. Could They All Be Prion Diseases ? *Science* (2000).
 34. Beck, J. a *et al.* PRNP allelic series from 19 years of prion protein gene sequencing at the MRC Prion Unit. *Human mutation* **31**, E1551-63 (2010).
 35. Dyrbye, H., Broholm, H., Dziegiel, M.H. & Laursen, H. The M129V polymorphism of codon 129 in the prion gene (PRNP) in the Danish population. *European journal of epidemiology* **23**, 23-7 (2008).
 36. Martins, V.R., Gomes, H.R., Chimelli, L., Rosemberg, S. & Landemberger, M.C. Prion diseases are under compulsory notification in Brazil Surveillance of cases evaluated by biochemical and / or genetic markers from 2005 to 2007. *Cancer Research* **1**, 347-355 (2007).
 37. Smid, J. *et al.* Creutzfeldt-Jakob disease associated with a missense mutation at codon 200 of the prion protein gene in Brazil. *Journal of the Neurological Sciences* 222-224 (2007).
 38. Muras, A.G. *et al.* Prion protein ablation increases cellular aggregation and embolization contributing to mechanisms of metastasis. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **125**, 1523-31 (2009).
 39. Antonacopoulou, A.G. *et al.* Prion protein expression and the M129V polymorphism of the PRNP gene in patients with colorectal cancer. *Molecular carcinogenesis* **49**, 693-9 (2010).

40. Combarros, O. *et al.* Interaction between prion protein and interleukin-1A genes increases early-onset Alzheimer's disease risk. *Journal of neurology* **254**, 115-7 (2007).
41. Cousin, E. *et al.* No replication of genetic association between candidate polymorphisms and Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging* **32**, 1443-51 (2011).
42. Del Bo, R. *et al.* Is M129V of PRNP gene associated with Alzheimer's disease? A case-control study and a meta-analysis. *Neurobiology of aging* **27**, 770.e1-770.e5 (2006).
43. Paula, E.V.D. *et al.* Genotype frequencies at codon 129 of the Prion Protein Gene in Brazil : implications in susceptibility to variant Creutzfeldt – Jakob disease compared to European and Asian populations. *European Journal of Human Genetics* 593-595 (2005).doi:10.1007/s10654-005-7455-5
44. Smid, J. Polimorfismos do gene da proteína príon celular em pacientes com doença de Alzheimer Jerusa Smid Polimorfismos do gene da proteína príon celular em pacientes com doença de Alzheimer. *Medicina* (2011).
45. Gacia, M. *et al.* Prion protein gene M129 allele is a risk factor for Alzheimer's disease. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)* **113**, 1747-51 (2006).

ANEXO I

Tabela 6 – Frequência genotípica e alélica do codon 129 do PRNP em diversas populações humanas.

População	Grupo Étnico	Cromossomos (N)	MM	MV	VV	M	V
CEPH		184				0.560	0.440
ENSEMBL_Venter		2		1.000		0.500	0.500
ENSEMBL_Watson		2			1.000		1.000
BUSHMAN_POP		4		1.000		0.500	0.500
pilot_1_YRI_low_coverage_panel		118				0.661	0.339
pilot_1_CEU_low_coverage_panel		120				0.667	0.333
ESP_Cohort_Populations		4544	0.426	0.467	0.108	0.659	0.341
AoD_African_American		90				0.600	0.400
AoD_Caucasian		92				0.760	0.240
AoD_Chinese		90				0.990	0.010
AoD_Japanese		90				0.990	0.010
HapMap-CEU	Européia	120	0.433	0.433	0.133	0.650	0.350
HapMap-HCB	Asiática	90	0.933	0.067		0.967	0.033
HapMap-JPT	Asiática	90	0.956	0.044		0.978	0.022
HapMap-YRI	África Sub-Sa	120	0.400	0.517	0.083	0.658	0.342
HapMap-CEU	Euroéia	226	0.442	0.425	0.133	0.655	0.345
HapMap-HCB	Asiática	86	0.930	0.070		0.965	0.035
HapMap-JPT	Asian	172	0.965	0.035		0.983	0.017
HAPMAP-ASW		98	0.306	0.469	0.224	0.541	0.459
HAPMAP-CHB	Asian	82	0.878	0.122		0.939	0.061
HAPMAP-CHD		170	0.976	0.024		0.988	0.012
HAPMAP-GIH		176	0.580	0.375	0.045	0.767	0.233
HAPMAP-LWK		180	0.456	0.500	0.044	0.706	0.294
HAPMAP-MEX		100	0.380	0.460	0.160	0.610	0.390
HAPMAP-MKK		286	0.490	0.322	0.189	0.650	0.350
HAPMAP-TSI		174	0.391	0.448	0.161	0.615	0.385

ANEXO II

Punding as a transient symptom in a patient with an early onset form of Dementia.

Oliveira MF, Gomes da Cunha JE, Oliveira JRM

- 1- Department of Neurosurgery - Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo, São Paulo-Brazil
- 2- Neuropsychiatric Department and Keizo Asami Laboratory - Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco-Brazil.

*Corresponding author:

Matheus Fernandes de Oliveira

mafernoliv@yahoo.com.br

Av. Pedro de Toledo, 1800 – Vila Clementino, São Paulo – São Paulo - Brazil

Introduction:

Punding is characterized by a peculiar stereotyped behavior with complex, excessive, nongoal oriented, repetitive patterns of engagement in various tasks, firstly described in amphetamine and cocaine addicts in California and Denmark. Classic examples of Punding are: Manipulation of technical

equipment, handling, examining or sorting through common objects, grooming, hoarding or starting in extended monologues devoid of content^{1,2,3}.

The behaviors may be linked to increased dopaminergic effect, since amphetamines, cocaine, and levodopa share a presynaptic mechanism. Selegiline might also play a role, enhancing the action of levodopa^{1,3,4}.

The prevalence reported of such finding was 26% among methylphenydate users (Rylander), and 8% among cocaine addicts^{1,2}. Nowadays, it is usually associated with antiparkinsonian drugs, in a prevalence ranging from 1 to 14% among users⁴.

Predisposing factors for Punding are high-dose levodopa (higher than 800mg/day) and dopamine agonists as monotherapy or in combination².

As far as we know, there is no reference in current literature linking Punding with dementia, neither in presentation nor as complication or evolution.

We describe here what we believe to be a case of Punding being manifested as part of the first symptoms in an early onset form of dementia.

Such clinical characterization is important to raise the possibility that such cases are under diagnosed and that Punding might be a much more prevalent clinical finding than previously assumed.

Case Descriptions:

We describe the case of a 60-year-old Brazilian man. He used to be a Sciences teacher in High School when 6 six years ago presented with progressive memory failure and hypobulia, after retirement. He was single and used to live with a few siblings.

Relatives refer that he became gradually more quiet and isolated, but initially without depressed mood.

He was in treatment of blood hypertension with loop diuretics and angiotensin receptor blockers and he smoked regular cigarettes for thirty years, stopping ten years ago.

The behaviors compatible with Punding were initially noticed when latter on he started to copy his own Science Books into a White sheet notebook, repeatedly and meaninglessly, occupying sometimes the whole day in this task, only stopping when strongly persuaded by his relatives. Such behavior was intermittent and appeared abruptly. Soon after that, aggressive behavior and motor agitation were also added to the general symptom's list.

There were no other neurological deficits and no signs of tremor, rigidity or bradykinesia. He denied seizures, headache or sleep disorders. A difficult interaction with the patient was constant during the clinical examination and his mood was irritable.

The initial hypothesis was that a Depressive episode was leading to major cognitive impairment (Pseudodementia) but a therapeutic proof with Paroxetine failed to decrease depressive symptoms, guiding the clinical investigation toward a more early onset form of neurodegenerative disorder, especially an early onset Alzheimer's Disease.

Mini Mental Status revealed a score of 3 out of 30, characterizing severe cognitive impairment. The laboratory screening for dementia was unremarkable. He was then evaluated by Psychiatry and Neurology team, being started with drugs to treat a potential EOAD, besides insomnia and psychomotor agitation (Rivastigmine, Trazodone, Prometazine and Clorpromazine). His follow-up showed partial control of the symptoms, without resolution. Chlorpromazine and Prometazine were soon after discontinued. Trazodone and Rivastigmine were maintained.

Initial imaging investigation with computerized tomography in 2007 showed global volumetric reduction of brain with deep sulci, fissures and lateral ventricles dilation. A nuclear magnetic resonance (NMR) done in 2010 showed advanced signs of cortical atrophy and microangiopathy in diffuse white matter, with both hippocampi presenting with quite reduced volumes (See Figure 1).

The nosologic retrospective definition, although hard to achieve in this particular case, was regarded as a demential profile. The lack of biopsy finding to determine the specific cause leaded us to consider as differential diagnosis Alzheimer disease, Frontotemporal dementia, Vascular dementia and associations of different types of dementia.

The patient is now 65 years old and we still follow up on his case in our general Hospital. The general cognitive decline is progressing.

Discussion:

Punding includes excessive humming or singing, inordinate writing, paper shuffling, blogging/journaling, doodling, painting, walkabouts, and reciting long meaningless soliloquies without an audience^{1,2,3,4,5}.

In our report we believe to be facing a new frontier toward the comprehension of the physiopathology of this symptom, now in Dementia. It was present in an elderly patient with cognitive deficit characterized especially by language and memory impairment, with adequate metabolic and nutritional profile and neuroimage studies compatible with primary dementias.

Even often described related to dopaminergic dysregulation neurotransmission, especially in parkinsonian patients, punding may be more complex than just dopaminergic stimulation, involving the brain stem serotonergic system and other neurotransmitters, thus explaining its genesis in seemingly unrelated neuropsychiatric disorders^{1,4}.

Once punding is diagnosed, specific treatment strategies could be adopted. A number of parkinsonism cases have been treated successfully through a change or reduction in medication, although this requires careful balance between the control of side effects and worsening motor functions. Classic neuroleptics must be avoided to preserve motor function⁵.

Although uncommon, punding provides many challenges for patients and Physicians. Physicians should be aware of the disorder because the spectrum of normal to abnormal behavior is unclear and patient insight is impaired, reducing the likelihood of spontaneous self-reporting. Commonly, the symptom is only triggered at home, and its notification depends on observation and cooperation of close relatives^{1,5}.

Conclusions:

To our knowledge, our report represents the first association between punding and demential disorders until the present day, giving light into new insights about physiopathology, clinical manifestations and treatment of this symptom.

We highlight the need of increasing awareness about Punding for general clinicians, neurologists and psychiatrists, who deal more often with such patients in a daily basis.

The subtlety of this theme reinforces the need of better concepts, objective scale evaluations and further studies in the purpose of better understanding of this interesting symptom.

Conflicts of interest:

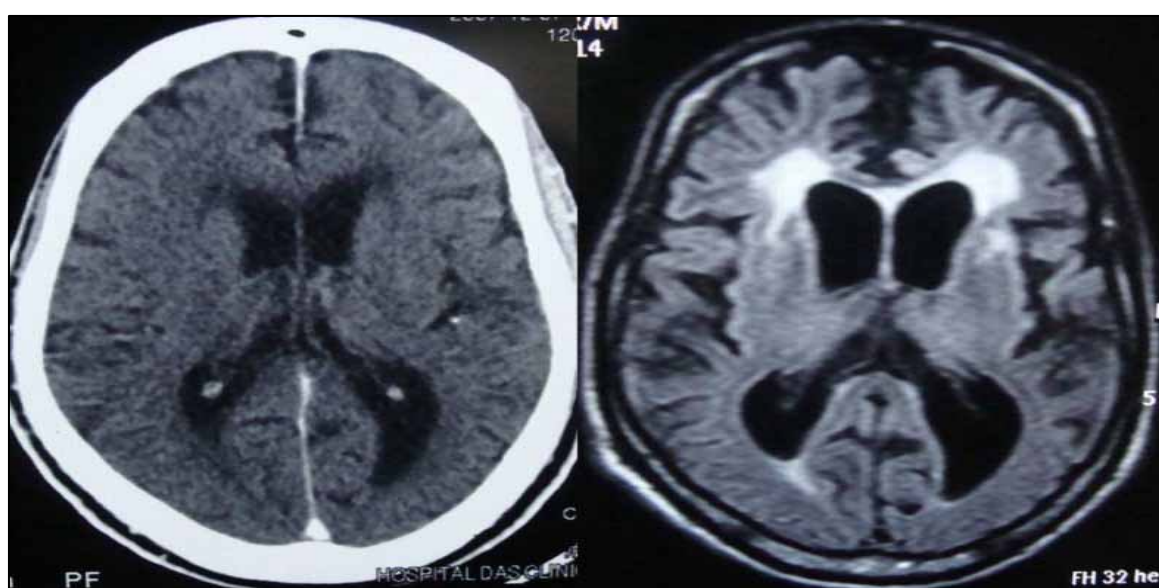
The authors declare no conflicts of interest.

References:

1. Fasano A, Petrovic I. Insights into pathophysiology of punding reveal possible treatment strategies. Mol Psychiatry. 2010 Jun;15(6):560-73.
2. Avila A, Cardona X, Bello J, Maho P, Sastre F, Martín-Baranera M. Impulse control disorders and punding in Parkinson's disease: the need for a structured interview. Neurologia. 2011 Apr;26(3):166-172. Epub 2010 Nov 3.
3. Silveira-Moriyama L, Evans AH, Katzenschlager R, Lees AJ. Punding and dyskinesias. Mov Disord. 2006 Dec;21(12):2214-7.

4. Evans AH, Katzenschlager R, Paviour D, O'Sullivan JD, Appel S, Lawrence AD, Lees AJ. Punding in Parkinson's disease: its relation to the dopamine dysregulation syndrome. Mov Disord. 2004 Apr;19(4):397-405.
5. Fasano A, Ricciardi L, Pettorruso M, Bentivoglio AR. Management of punding in Parkinson's disease: an open-label prospective study. J Neurol. 2010 Nov 12. [Epub ahead of print]

Figure 1. Imaginological study of the subject in the onset of the symptoms in the year of 2007 (left) and in the follow up, in the year of 2010 (right). Although the modalities of studies are different (tomography at the left and magnetic resonance at the right), there is a notable accentuation of cortical atrophy and dilation of ventricles from one study to the other, suggesting evolution of demential disease.



ANEXO III

Are Brazilian cervids on risk of prion diseases?

Falcão, CBR¹; Duarte, JMB²; Cunha, JEG³; Oliveira, JRM⁴; Garcia, JE¹

¹Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, PE, ²Universidade Estadual Paulista, Campos de Jaboricabal, Jaboricabal, SP, ³Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Imunopatologia Keizo Azami, PE, ⁴Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Neuropsiquiatria, PE
 caiofal@uol.com.br

Keywords: Prion diseases, Cervids, Single nucleotides polymorphism, *PRNP*, CWD

Prion diseases are a group of neurodegenerative fatal disorders with undiscovered treatment that affects humans and non-human. The most famous prion diseases are Creutzfeldt-Jakob from humans and bovine spongiform encephalopathy (BSE). Chronic wasting disease (CWD) is a prion disease of cervids that has been regarded as a health public problem in USA, Canada and North Korea. Prion diseases are not completely understood but the most accepted theory assumes that prion it is a modified protein that can convert normal protein into a new form. This new design is insoluble and causes the death of neuronal cells and the characteristics vacuums on the brain tissue. Recent researches have shown that some animals present more resistance to the infection. This resistance has been commonly associated with the sequence of nucleotides on the gene which codify the prion protein (*PRNP*). Single nucleotides polymorphism (SNP's) at specific codons has been highly associated with development of neurodegenerative disease on *Cervidae* family. The presence of Methionine/Leucine at codon 132 and Serine/Phenylalanine at codon 225 interferes on the animals' susceptibility. The animals (*Cervus elaphus*, *Odocoileus hemionus*) encoding Met/Met at 132 are overrepresented on CWD positive. The same happens on 225SS that are proportionally 30 times more present on infected animals. In order to identify the presence/absence of polymorphism, and consequently the potential susceptibility to develop CWD, we analyzed samples from three Neotropical Deer (n:20) (*Mazama gouazoubira*, *Blastocerus dichotomus*, *Ozotocerus bezoarticus*). Genomic DNA was isolated and a fragment of 800bp from the Exon 3 of *PRNP* was amplified by PCR and sequenced. Sequences were aligned and the results have shown that the *PRNP* Exon 3 sequence from Brazilian deer are highly conserved. All animals presented Met/Met at codon 132 and SS at codon 225. These polymorphisms are overrepresented on CWD positive cases on *Cervus spp* and *Odocoileus spp*. The presence of these polymorphisms suggests the potential susceptibility to development of CWD in Brazilian deer, although cases of CWD have never been registered in Brazil. The presence of the susceptibility-associated polymorphism and the lack of infected animals' description are of interest. Regarding prion diseases have the majority of cases related as "sporadic", almost like randomly, it is expected that animals presenting the polymorphism and developing the disease been found anywhere around the world. So, why Brazilian deer did not develop the disease, or could Brazil's cases have been sub-notified? The necessity of a correct and precise diagnostic and notification is important to understand the patterns of disease and to avoid the transmissibility to humans, which although improbable, cannot be discarded. Financial Support: CNPq (Proc. 476242/2009-6 and JRMO fellowship), FACEPE (CBRF fellowship) and CAPES (JEGC fellowship)

Epidemiological genetics and Meta-analysis of PRNP polymorphisms (M129V and E200K) in Alzheimer's Disease

Pimentel, LF¹; Gomes da Cunha, JE¹; Zatz, M³; Oliveira, JRM^{1,2}

¹Keizo Asami Laboratory – LIKA – Federal University of Pernambuco, Recife-PE, ²Neuropsychiatry Department Federal University of Pernambuco, Recife-PE, ³Human Genome Study Center – University of São Paulo, São Paulo, SP
lylyan.pimentel@gmail.com

Keywords: PRNP, polymorphism M129V, E200K mutation, Alzheimer's Disease, Creutzfeldt-Jakob Disease

Alzheimer's disease (AD) accounts for more than half of dementia diagnosis in the world population and it is characterized by the presence of neurofibrillary tangles and B-amyloid deposits, followed by the early (EOAD) and late onset (LOAD) forms of clinical manifestations. The clinical evolution of AD is slow, progressive and extends usually over several years. Moreover, Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) is a rare form of dementia which presents a rapid progression attributed to the prion protein, encoded by the PRNP gene. Some polymorphisms are associated with genetic risk factors for CJD, such as M129V (rs1799990) and the E200K (rs28933385). Curiously, several authors reported neuropathological and clinical overlapping between AD and CJD, with a few association studies generating conflicting results. In order to investigate the possible correlation of these genotypes with AD, we have analyzed the distribution of the M129V and E200K polymorphisms in Brazilian controls samples and AD patients. A complementary meta-analysis was done using the ALZGENE database. Genotyping was assessed by Polymerase Chain Reaction (PCR) and followed by enzyme digestion or automatic sequencing. So far, 58 patients were genotyped for the E200K and 12 patients were sequenced for the M129V (All were MM). Only 07 Controls were genotyped for the E200K. All the samples genotyped for the E200K were E homozygous. Even with the limited number of controls genotyped for the E200K genotype, we see that all patients are homozygous for the E allele, which is not the risk factor to CJD. Meta-Analysis for the M129V in ALZGENE database employed twenty published studies on the PRNP gene in samples from various ethnic groups and only 5 reported positive association. The results for this analysis showed conflicting findings, probably due to the variation of the genetic background for different populations. There was also no distribution difference in a few studies that allowed to distinguish the EOAD and LOAD forms. Additional sequencing and genotyping analysis are underway with the samples for the PRNP gene in order to obtain more conclusive results, however, preliminary analysis suggests that the M129V and E200K polymorphism plays a limited role as a genetics risk factor for AD. Financial Support: CNPq, PROPESQ-UFPE, CAPES, and FACEPE.

ANEXO IV

Full Title:

Exaggerated blood pressure response during exercise treadmill testing: functional and hemodynamic features, and risk factors

Brief Title:

Exaggerated blood pressure response to exercise treadmill testing

Authors:

Sandro G. LIMA^a, Maria de F. P. M. de ALBUQUERQUE^a, João R. M. de OLIVEIRA^b, Constância F. J. AYRES^a, José E. G. da CUNHA^b, Danyllo F. de OLIVEIRA^b, Roberta R. de LEMOS^b, Manuela B. R. de SOUZA^b, Odwaldo B. e SILVA^c.

a. Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Recife-PE, Brazil.

b. Keizo Asami Laboratory, Federal University of Pernambuco, Recife-PE, Brazil

c. Federal University of Pernambuco, Recife-PE, Brazil.

This work has not been previously published.

Financial Support: FACEPE.

Conflict of interest: None of the authors have declared conflicts of interest.

Address of corresponding author:

Rua Frei Jaboatão, 180/2802 - Torre - Recife-PE, Brazil. CEP: 50710-030.

e-mail: sandrolima2002@gmail.com

Number of words: 4350

Number of tables: 7

ABSTRACT:

The factors which contribute to an exaggerated blood pressure response (EBPR) during the exercise treadmill test (ETT) are not wholly understood. The association between the insertion/deletion

polymorphisms of the angiotensin-converting enzyme (ACE) and M235T of the angiotensinogen (AGT) with EBPR during ETT still remains unstudied. **OBJECTIVE:** to identify and compare the risk factors for hypertension between normotensive subjects with EBPR and those who exhibit a normal curve of blood pressure (BP) during ETT. **METHODOLOGY:** In a series of EBPR cases from a historical cohort of normotensive individuals, a univariate analysis was performed to estimate the association of the studied factors with BP behaviour during ETT. Additionally, logistic multivariate regression was conducted to analyse the joint effects of the variables. P-values above 0.05 were considered statistically significant. **RESULTS:** From a total of 10.027 analysed examinations, only 219 met the criteria employed to define EBPR, which resulted in a prevalence of 12.6%. For the systolic component of the BP, hyperreactive subjects displayed a mean age and body mass index (BMI) significantly higher than the others ($p=0.002$ and <0.001 , respectively). No association was observed between the polymorphisms cited above and EBPR. An analysis of the joint effect of variables has indicated that only age ($P < 0.001$) and BMI ($p=0.001$) were specifically associated to systolic blood pressure (SBP) during exercise. **CONCLUSION:** Age and BMI were the only factors that independently influenced EBPR during ETT.

Key words: risk factors, hypertension, exaggerated blood pressure response, genes.

INTRODUCTION

Neither the physiopathological mechanisms involved in the way blood pressure (BP) responds to exercise, nor the factors that contribute to exaggerated blood pressure response (EBPR) during exercise treadmill testing (ETT) are fully understood. Comparisons between normoreactive and hyperreactive patients, considering socio-demographic and clinical features, have mostly been carried out in small cohorts, using nonstandard criteria, which may have significantly influenced the results. Several authors have compared small normoreactive and hyperreactive cohorts but while these groups

have been assessed with regard to cholesterol, triglycerides and glucose levels, smoking habits and alcohol consumption, no differences were observed between the groups¹⁻⁴. However, Jae et al⁵ observed statistically significant differences regarding all the above-mentioned variables (with the exception of alcohol) when comparing 8969 normoreactive and 375 hyperreactive patients.

It has been shown that responses to physical exercise vary amongst individuals, suggesting that the outcome of exercise might be affected by genetic variations⁶. Similarly, several genes which encode for proteins of the renin-angiotensin-aldosterone system have been shown to play a role in the aetiopathogeny of hypertension. However, there are conflicting results within studies that have assessed the relationship between the polymorphisms in these genes and hypertension. Some analyses have shown that the D allele of the angiotensin-converting enzyme (ACE) gene increases the threshold of developing hypertension. On the other hand, other studies have described the I allele as being responsible for the phenotype or even a lack of association between this polymorphism and hypertension. Contradictory findings have also been described concerning an association between the M235T polymorphism of the angiotensinogen gene (AGT) and hypertension⁷. However, to date, any association between such polymorphisms and EBPR during ETT, has remained unstudied.

Considering that hyperreactive individuals are four to five times more likely to develop hypertension⁸⁻¹⁰, and that primary healthcare strategies have already been established as an effective prevention for this disease, understanding and developing forms of combating the risk factors that influence EBPR are fundamental for preventing hypertension and circulatory system diseases.

Therefore, the objective of this study has been to describe and compare the frequency of risk factors for hypertension (genetic and environmental), as well as the hemodynamic and functional variables of ETT among normotensive individuals who display EBPR and those with normal BP during ETT.

METHODOLOGY

This was a series of EBPR cases from a historical cohort of normotensive subjects who underwent ETT at the beginning of the study. A group, composed of individuals who presented abnormal BP behavior during exercise (Δ SBP $\geq$ 7.5 mmHg/MET and/or SBP at the peak of the exercise $\geq$ 220 mmHg or Δ DBP $\geq$ 15 mmHg, starting from normal BP levels at rest) was compared to another in which patients displayed normal BP during physical exercise. Any patients taking antihypertensives or any other drugs which could potentially interfere with BP behavior or heart rate (HR), individuals undergoing diagnostic investigation for hypertension or those who even after meeting inclusion criteria, presented any thoracic discomfort or localized pain, cardiac rhythm or conduction disturbances, or any suspicion of electrocardiographic alterations of miocardic ischemia, patients who presented pulmonary

congestion or bronchospasm during ETT and those who did not reach submaximal HR during exercise, were all excluded from the study. The BP behavior under exercise was analyzed as a dependent variable. Genetic polymorphism and classic risk factors for hypertension (diabetes mellitus-DM, hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia, patients whose immediate relatives have been affected by hypertension, skin color and BMI) were analyzed as independent variables. Furthermore, the analysis was stratified considering the EBPR subgroups: reactive hypertensive individuals through the systolic component (SRH) and reactive hypertensive individuals through the diastolic component (DRH).

The study protocol was approved by the CPqAM-FIOCRUZ ethics committee and all participants signed the terms of consent.

The ETT analysis was conducted by one single physician, using the ramp protocol.¹¹ Blood pressure was measured, both at rest and during exercise, using a mercury sphygmomanometer. Measurements were taken at regular three-minute intervals during the exercise phase and during the first, second, fourth and sixth minutes of the recovery phase. For SBP, phase “1” of the Korotkoff sounds was considered and for DBP phase “5”.

All patients enrolled on this study were sent to a clinical analysis laboratory, where blood samples were collected and DNA was extracted with standard salting out protocols. The genomic region of the polymorphisms considered for investigation during this study were amplified by polymerase chain reaction (PCR) with the following primers for AGT FW 5'- GGA AGG ACA AGA ACT GCA CCT C – 3' and RV 5' - CAG GGT GCT GTC CAC ACT GGA CCC C – 3'¹² and for ACE FW 5' – CYG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT - 3' and RV 5' – GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T - 3'¹³. To verify the ACE allelic distribution throughout the cohort, 1.5% agarose was employed. After amplifying the AGT region of interest, PCR products were purified enzymatically, using exoquinase and shrimp alkaline phosphatase. Following this, the purified products were sequenced in a MegaBACE 1000. Univariate analysis was conducted in order to evaluate the association of each independent variable with BP behaviour during ETT. Multivariate logistic regression was carried out to evaluate the joint effect of the variables. Results which presented descriptive levels (P-value) below 0.05 were considered statistically significant. Hardy-Weinberg equilibrium was also tested and the chi-square test was employed to verify if the allelic frequencies were in accordance with those predicted by the equation. A possible occurrence of selection bias in this study could be minimized as long as the normoreactive and hyperreactive individuals were selected from the same population. Memory and information bias may have occurred during data collection concerning lifestyle and morbid antecedents, particularly self-reported hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia and DM, which were not measured by biochemical tests.

RESULTS

From the 10.027 analyzed examinations, only 219 were identified as hyperreactive, which therefore yielded a prevalence of 12.6%.

Systolic blood pressure (SBP) and diastolic blood pressure (DBP) at rest, at the height of exercise and the pressure variation between rest and exercise, are presented in Table 1.

DBP variation from dorsal decubitus position to orthostatic position was greater in hyperreactive individuals than normoreactive (5.7 vs 2.3 mmHg, $p<0,001$). However, the same behavior was not observed with regard to SBP (5.7 vs 3.9 mmHg, $p=0.140$). With respect to HR, it was observed in the hyperreactive group that the variation associated to posture change was 11.2 bpm, whilst in the normoreactive group this variation was 9.9 bpm ($p=0.266$).

The HR at rest for the hyperreactive individuals both in the orthostatic or dorsal decubitus positions was similar to the normoreactive group ($p=0.992$ and 0.663 respectively). On the other hand, the HR measured at maximum exercise was significantly lower in the group that displayed EBPR throughout the systolic component of the BP ($p<0,001$). Both groups displayed a decrease in HR during the first minute of recovery time above 12 bpm. However, in SRH, the decrease was significantly greater ($p<0.001$).

The ergometric treadmill ramp inclinations, speeds, maximum oxygen consumption (VO_2) and equivalent metabolic rates achieved by SRH individuals were significantly lower than the normoreactive individuals, as shown in Table 2.

Information concerning the risk factors for hypertension, SRH and DRH among the normoreactive individuals, collected on entering the cohort is presented in Table 3.

The I/D polymorphisms of the ACE gene and M235T of the AGT were also investigated as risk factors for EBPR. Neither the allelic or genotypic distribution revealed any statistically significant difference between the groups (Tables 4 and 5).

The joint effect of the AGT and ACE polymorphisms on the BP during ETT was also assessed in this population. No statistically significant difference in the haplotypic distribution between the normoreactive and hyperreactive groups was observed (Table 6).

The analysis of the joint effect of variables, a family history of hypertension, BMI and age upon the BP response to exercise, was conducted through a multinomial logistic model, where the reference category was the normoreactive group. This analysis has shown that only age ($P<0.001$) and BMI ($p=0.001$) were associated to BP behavior during physical exercise. Table 7 shows that the association between age and BMI occurred specifically with the systolic component of the BP during exercise. It was observed no association between the I/D polymorphisms of the ACE gene and M235T AGT with EBPR (table 8), even after having controlled the variables age and BMI.

DISCUSSION

Although the physiopathological effects involved in EBPR are not completely understood, the attributed risk for this condition to develop hypertension may be based on findings, which suggest that cardiovascular reactivity, by itself, brings negative outcomes, even in the absence of the clinically manifested disease^{14,15}. Studies that have assessed the endothelial function of patients with EBPR have shown a significant reduction of endothelium-dependent vasodilatation capacity^{3,16,17}. These studies corroborate the hypothesis that the cardiovascular system of hyperreactive individuals worked with normal cardiac output (CO) and an increase in peripheral vascular resistance (PVR), whilst the normoreactive individuals responded to physical exercise with an increase of CO and a reduction in PVR. Other hypotheses have been suggested, among other factors: inflammatory mechanisms¹⁸, neurohumoral^{3,15} and poor physical condition^{15,19,20}.

The higher prevalence of EBPR encountered in the present study (12.6%) in relation to that reported in the literature may be partly justified by the very stringent criteria adopted by the study in order to define EBPR, which caused the denominator to suffer an expressive reduction. Many patients were excluded in spite of having presented EBPR, because they also had other conditions that did not meet the criteria for defining EBPR, such as: abnormal blood pressure at rest, baseline hypertension, were taking medications that could interfere with the BP behaviour during exercise, felt pain or discomfort during ETT that could trigger high BP, among others. The exclusion of these patients enabled us to select only the patients who presented EBPR without any association with other non-related conditions. Jae et al¹⁸ reported a prevalence of 4.1%, however EBPR was defined as a higher SBP ≥ 210 mmHg, and did not take into account either the amount of physical exercise performed or the DBP. Sharabi et al²¹ considered EBPR with higher SBP and DBP levels of above 200 mmHg and 100 mmHg, respectively. These authors found a prevalence of 6.3%. The lack of homogeneity to define EBPR may have been one of the factors influencing the prevalence variation reported in other studies.

The present study observed that SBP levels at rest, and BP and HR variations between the lying position to orthostatic, were higher in hyperreactive individuals than in normoreactive individuals. It has been demonstrated that BP levels of hyperreactive individuals, in random measures, at rest, are significantly higher than those of normoreactive individuals^{2,21}. Rostrup et al²² reported that normotensive subjects with higher tension levels at rest, show an increase in vascular reactivity to mental stress and a consistent correlation with cardiovascular risk factors. Diwan et al²³, also verified that the BP of hyperreactive individuals at rest were in the pre-hypertension category of the VII Joint National Committee.

It is possible that sympathetic tonus, assessed by HR at rest, is similar between the groups, since there was no difference in the HR at rest between the hyperreactive and normoreactive subjects. The fact that hyperreactive individuals presented a lower HR at the peak of physical exercise when

compared to the normoreactive individuals, may be explained by an early interruption of the examination due to EBPR, or indeed a shorter exercise period (no statistically significant difference). Both factors cited above might also be influenced by physical characteristics such as age and BMI, which were significantly higher in the hyperreactive group. It has been described that limitrophe hypertensive subjects present EBPR and a faster HR as a response to several stress factors, in comparison to normotensive subjects¹⁴. This could permit us to suggest that if the exercise had not been interrupted, either because of EBPR or functional limitations, the hyperreactive group would have been expected to present a higher peak HR than the NR.

The slow decrease of the HR from the peak of the exercise to the first minute of recovery has been associated to a more increased risk of cardiovascular events^{24,25}. It was observed, in both groups, that the decreasing HR in this period of the ETT was over 12 bpm, however, in the SRH group, this decrease was significantly more accentuated. A possible explanation for this finding might be encountered in the BP regulation mechanisms. In individuals with a normal BP response to exercise, an elevated SBP during exercises such as swimming, walking, cycling, among others, may occur proportionally to the amount of effort. A decreased PVR is balanced by an increase in CO as a way of preventing BP reductions. EBPR individuals present higher PVR during exercise, thus, it is possible that the mechanism of BP self-regulation occurs exactly opposite to that which takes place in normoreactive individuals. As a form of compensating for the higher PVR, these individuals would show a more accentuated decrease in HR, which in its turn, would directly influence the CO and consequently, the BP. This hypothesis is enhanced by the finding of lower maximum VO_2 in the SRH group as compared to the normoreactive group. Among the factors which restrain a greater VO_2 more expressively, it is possible to highlight the CO which in its turn, is influenced by HR and systolic volume²⁶.

The evaluation of the metabolic and functional variables of the ETT allows us to conclude that SRH individuals present a lower metabolic and functional performance to that of normoreactive individuals. It is likely that age and BMI, significantly higher in the former group, may explain the ETT performance-related differences. Takamura et al²⁷ evaluated the ventricular function by echocardiogram in patients with and without EBPR during exercise, and concluded that, even in the absence of hypertension, hyperreactive individuals displayed diastolic dysfunction and, as a consequence, an intolerance to exercise. Sharabi et al²¹ reported that the time hyperreactive individuals spent undergoing ETT was significantly shorter than in the control group.

With regard to the classic risk factors for hypertension, our results do not reveal any difference between the normoreactive and hyperreactive individuals in relation to gender and skin color. Other studies have also shown no differences in these variables, even between the normotense and hypertense groups²⁸⁻³². Knowing that that alterations provoked in the blood vessels by DM and deslipidemia gradually settle down, associated to the fact that there is no available information

concerning the time of diagnosis of these risk factors in each of the individuals; it is possible to justify the lack of association in our results. Sharabi et al²¹ found no difference in blood glucose levels, total cholesterol and triglyceride levels between the normoreactive and the hyperreactive groups.

The higher prevalence of isolated systolic hypertension observed in the elderly is well described in the literature³³. Although the mean age of the SRH subjects, at the time of undertaking ETT, did not allow us to classify them as elderly, this was significantly higher in this group than in the DRH and normoreactive groups. Thus, the effect of the age variable on the SBP during exercise is in accordance with the currently available information in the literature regarding the relationship between age and hypertension. The gradual loss of vessel elasticity and, the consequent reduction in vasodilatation capacity might explain our results. In this sense, Chang et al³ showed that the vasodilatation extension was proportionally opposite to age and SBP variation.

Excess weight is related to an increase in PVR, thus, some research has shown a directly proportional relationship between weight gain and high BP³⁴. In the present study it has been shown that the SRH group presented a BMI significantly higher than the normoreactive and DRH groups, which may justify *per se* the association between BMI and SRH. Widgren et al³⁵ reported that individuals with a family history of hypertension have a greater reactivity to physical and mental stress than those with none at all. Diwan et al²³ and Sharabi et al²¹ reported that the number of individuals with EBPR was significantly greater in those who had hypertensive relatives compared to those who did not. It is possible that our results were biased, since information was collected directly with the participants of the cohort, therefore, relatives were not directly examined.

No studies have been found in the literature which have analysed the association between genetic polymorphisms and EBPR. Some have reported the influence of determined genes during physical exercise⁶, however they have not specifically evaluated BP during exercise. It was decided to study the I/D ACE and M235T AGT polymorphisms due to the current controversy in the literature with respect to the real relation between such polymorphisms and hypertension⁷. In this study, no association was identified between the I/D polymorphisms of ACE and M235T of AGT with EBPR. However it is possible that this association exists in populations where there is an association between these polymorphisms with hypertension, considering that EBPR is a pre-clinical stage of hypertension. There is a need to investigate this hypothesis in further studies.

In summary, only age and BMI independently influenced EBPR during ETT. If therefore age and BMI are risk factors for EBPR and if this is a risk marker for hypertension, then preventive strategies may be applied with greater emphasis to patients who present EBPR rather than those with normal BP during exercise, even though they present above-normal BMI and are more advanced in years. In other words, identifying the risk factors in individuals who have markers of the disease (pre-clinical

stages) is of even greater importance, since they are individuals who have no overt signs of the disease, although they are actually in the process of developing the disease.

REFERENCES

1. Miyai N, Arita M, Morioka I, Takeda S, Miyashita K. Ambulatory blood pressure, sympathetic activity, and left ventricular structure and function in middle-aged normotensive men with exaggerated blood pressure response to exercise. *Med Sci Monit* 2005; 11 (10): 478-484.
2. Oliveira LB, Cunha AB, Martins WA, Abreu RFS, Barros LSN, Cunha DM, Nóbrega ACL, Martins-Filho LR. Monitorização ambulatorial da pressão arterial e pressão casual em hiperreatores ao esforço. *Arq Bras Cardiol* 2007; 88 (5): 565-572.
3. Chang HJ, Chung J, Choi SY, Yoon MH, Hwang GS, Shin JH, Tahk SJ, Choi BI. Endothelial dysfunction in patients with exaggerated blood pressure response during treadmill test. *Clin Cardiol* 2004; 27(7): 421-425.
4. Shim CY, Ha JW, Park S, Choi EY, Choi D, Rim SJ, Chung N. Exaggerated blood pressure response to exercise is associated with augmented rise of angiotensin II during exercise. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52(4): 287-292.
5. Jae SY, Fernhall B, Heffernan KS, Kang M, Lee MK, Choi YH, Hong KP, Ahn ES, Park WH. Exaggerated blood pressure response to exercise is associated with carotid atherosclerosis in apparently healthy men. *J Hypertens* 2006; 24 (5): 881-887.
6. Oliveira EM, Alves GB, Barauna VG. Sistema renina-angiotensina: interação gene-exercício. *Rev Bras Hipertens* 2003; 10: 125-129.
7. Lima SG, Hatagima A, Silva NLCL. Sistema Renina-Angiotensina: é possível identificar genes de suscetibilidade à Hipertensão? *Arq Bras Cardiol* 2007; 89 (6): 427-433.
8. Miyai N, Arita M, Morioka I, Miyashita K, Nishio I, Takeda S. Exercise BP response in subjects with high-normal BP: exaggerated blood pressure response to exercise and risk of future hypertension in subjects with high-normal blood pressure. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36(5): 1626-1631.

9. Miyai N, Arita M, Miyashita K, Morioka I, Shiraishi T, Nishio I. Blood pressure response to heart rate during exercise test and risk of future hypertension. *Hypertension* 2002; 39(3): 761-766.
10. II DIRETRIZES da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre teste Ergométrico. *Arq Bras Cardiol* 2002; 78 Suppl 2.
11. Myres J, Froelicher VF. Exercise testing: procedures and implementation. *Cardiol Clin* 1993; 11(2): 199-213.
12. Araújo MS, Menezes BS, Lourenço C, Cordeiro ER, Gatti RR, Goulart LR. O gene do angiotensinogênio (M235T) e o infarto agudo do miocárdio. *Rev Assoc Med Bras* 2005; 51(3): 164-169.
13. Alvarez R, Reguero JR, Batalla A, Iglesias-Cubero G, Cortina A, Alvarez V, Coto E. Angiotensin-converting enzyme and angiotensin II receptor 1 polymorphism: association with early coronary disease. *Cardiovascular Res* 1998; 40(2): 375-379.
14. Everson SA, Kaplan GA, Goldberg DE, Salonen JT. Anticipatory blood pressure response to exercise predicts future high blood pressure in middle-aged men. *Hypertension* 1996; 27: 1059-1064.
15. Marsaro EA, Vasquez EC, Lima EG. Avaliação da pressão arterial em indivíduos normais e hiperreatores. Um estudo comparativo dos métodos de medidas casual e da MAPA. *Arq Bras Cardiol* 1996; 67(5): 319-324.
16. Stewart KJ, Sung J, Silber HA, Fleg JL, Kelemen MD, Turner KL, Bacher AC, Dobrosielski DA, DeRegis JR, Shapiro EP, Ouyang P. Exaggerated exercise blood pressure is related to impaired endothelial vasodilator function. *Am J Hypertens* 2004; 17(4): 314-320.
17. Tzemos N, Lim PO, MacDonald TM. Exercise blood pressure and endothelial dysfunction in hypertension. *Int J Clin Pract* 2009; 63(2): 202-206.
18. Jae SY, Fernhall B, Lee M, Heffernan KS, Lee MK, Choi YH, Hong KP, Park WH. Exaggerated blood pressure response to exercise is associated with inflammatory markers. *Journal of Cardiopulmonary Rehabilitation* 2006; 26(3): 145-149.

19. Miyai N, Arita M, Miyashita K, Morioka I, Shiraishi T, Nishio I, Takeda S. Antihypertensive effects of aerobic exercise in middle-aged normotensive men with exaggerated blood pressure response to exercise. *Hypertension Research* 2002; 25(4): 507-514.
20. Bond V, Millis RM, Adams RG, Oke LM, Enweze L, Blakely R, Banks M, Thompson T, Obisesan T, Sween JC. Attenuation of exaggerated exercise blood pressure response in African-American women by regular aerobic physical activity. *Ethnicity and Disease* 2005; 15 Suppl 5: S5-13.
21. Sharabi Y, Ben-Cnaan R, Hanin A, Martonovitch G, Grossman E. The significance of hypertensive response to exercise as a predictor of hypertension and cardiovascular disease. *Journal of Human Hypertension* 2001; 15(5): 353-356.
22. Rostrup M, Westheim A, Kjeldsen SE, Eide, I. Cardiovascular reactivity coronary risk factors and sympathetic activity in Young men. *Hypertension* 1993; 22: 891-9.
23. Diwan SK, Jaiswal N, Wanjari AK, Mahajan SN. Blood pressure response to treadmill testing among medical graduates: the right time to intervene. *Indian Heart J* 2005; 57(3): 237-240.
24. Morise AP. Heart rate recovery. Predictor of risk today and target of therapy tomorrow? *Circulation* 2004; 110: 2778-2780.
25. Vivekamamthan DP, Blackstone EH, Pothier CE, Lauer MS. Heart rate recovery after exercise is a predictor of mortality, independent of the angiographic severity of coronary disease. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42(5): 831-838.
26. Hespanha R. Função Respiratória. In: Hespanha R. Ergometria. Bases fisiológicas e metodologia para a prescrição de exercício. 1.ed. Rio de Janeiro: Rubio; 2004. 53-70.
27. Takamura T, Onishi K, Sugimoto T, Kurita T, Fujimoto N, Dohi K, Tanigawa T, Isaka N, Nobori T, Ito M. Patients with a hypertensive response to exercise have impaired left ventricular diastolic function. *Hypertension Research* 2008; 31(2): 257-263.
28. Cipullo JP, Martin JFV, Ciorlia LAS, Godoy MRP, Cação JC, Loureiro AAC, Cesarino CB, Carvalho AC, Cordeiro JAC, Burdmann B. Prevalência e fatores de risco para hipertensão em uma população urbana brasileira. *Arq Bras Cardiol* 2010; 94(4): 519-526.

29. Duncan BB, Schmidt MI, Polanczyk CA, Homrich CS, Rosa RS, Achutti AC. Fatores de risco para doenças não transmissíveis em área metropolitana na região sul do Brasil. Prevalências e simultaneidades. Rev Saúde Pública 1993; 27(1): 143-8.
30. Fuchs FD, Moreira LB, Moraes RS, Bredemeier M, Cardozo SC. Prevalência da hipertensão arterial sistêmica e fatores associados na região urbana de Porto Alegre. Estudo de base populacional. Arq Bras Cardiol 1994; 63(6): 473-479.
31. Gillum RF. Pathophysiology of hypertension in blacks and whites. A review of the basis of racial blood pressure differences. Hypertension 1979; 1: 468-475.
32. Klein CH, Silva NAS, Nogueira AR, Bloch KV, Campos LHS. Hipertensão arterial na Ilha do Governador, Rio de Janeiro, Brasil. II. Prevalência. Cad Saúde Públ 1995; 11(3): 389-394.
33. Franklin SS. Hypertension in older people: Part 1. The Journal of Clinical Hypertension 2006; 8(6): 444-449.
34. Nadruz Jr W, Coelho OR. A inter-relação da hipertensão arterial com os outros fatores de risco cardiovascular. In: Brandão A. Hipertensão. 1.ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2006. 159-167.
35. Widgren BR, Wikstrand J, Berglund G, Andersson OK. Increased response to physical and mental stress in men with hypertensive parents. Hypertension 1992; 20: 606-611.