

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

Luana Pretto

**Polimorfismos nos Genes *DNMT1* e
DNMT3B: Impacto sobre Escores de
Memória**

UFCSPA
Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

Porto Alegre
2015

Luana Pretto

Polimorfismos nos Genes *DNMT1* e *DNMT3B*: Impacto sobre Escores de Memória

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Dr^a Marilu Fiegenbaum

**Porto Alegre
2015**

Agradecimentos

À Deus, por sempre iluminar meus caminhos e guiar meus passos, me permitindo chegar até aqui e atingir mais esta grande conquista em minha vida.

À Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), pelo ensino e formação de qualidade.

À minha orientadora, Prof^a Marilu Fiegenbaum, pela disponibilidade e disposição para a orientação do trabalho, pela confiança depositada e por todo conhecimento compartilhado.

Às mestres Tatiane Jacobsen da Rocha e Grasiela Agnes, pela receptividade, suporte técnico no laboratório e troca de conhecimentos.

À secretária do Programa de Pós-graduação em Patologia, Maristela Pasin, pela paciência, pela atenção e pelas inúmeras ajudas.

À equipe do Banco de Pele da ISCMPA, meu chefe Dr. Eduardo Chem e minha amiga e colega Aline Damo Souza, por todo apoio, compreensão e amizade.

Aos meus pais, Luiz Antonio e Suzana, por todo amor recebido ao longo da minha vida e pelo incansável incentivo na dedicação aos estudos.

Aos meus irmãos, Angelo e Luiza, pelas conversas e amizade.

Ao meu noivo, Leonardo, pelos anos maravilhosos vividos com muito afeto, compreensão e companheirismo, e pelo futuro promissor que sonhamos juntos.

Ao Boris, meu “filhote” de quatro patas, pela companhia incansável nas várias madrugadas que se sucederam escrevendo esta dissertação.

Sumário

1. Introdução	01
1.1. Envelhecimento populacional	01
1.2. A memória	03
1.2.1. Classificação da memória	08
1.3. Epigenética, Metilação de DNA e Memória	12
1.3.1. DNA metiltransferases e a variabilidade genética	16
1.4. Referências bibliográficas	19
2. Objetivos	26
2.1. Objetivos específicos	26
3. Artigo científico redigido em inglês	28
4. Considerações finais	47
5. Anexos	49
Anexo 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	50
Anexo 2 - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre	52
Anexo 3 - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Feevale	54
Anexo 4 - Ficha de informações do paciente / voluntário	55
Anexo 5 - Questionário sobre padrões de atividades	57
Anexo 6 - Informações adicionais de Materiais e Métodos	58

Lista de abreviaturas utilizadas

AAMI: Age-associated memory impairment

APOC1: Gene da apolipoproteína C1

APOE: Gene da apolipoproteína E

BDNF: Gene do fator neurotrófico derivado do cérebro

DA: Doença de Alzheimer

DNMT: DNA metiltransferase

DNMT1: DNA metiltransferase 1

DNMT3A: DNA metiltransferase 3A

DNMT3B: DNA metiltransferase 3B

DNA: Ácido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic acid)

ECA: Gene da enzima conversora de angiotensina

HTR1A: Gene do receptor 1A do neurotransmissor serotonina

HTR2A: Gene do receptor 2A do neurotransmissor serotonina

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

NIMH: National Institute of Mental Health

PCR: Reação em cadeia da polimerase (Polymerase chain reaction)

QI: Quociente de inteligência

RAVLT: Rey Auditory-Verbal Learning Test

SLC6A4: Gene do transportador de serotonina (solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 4)

SNC: Sistema nervoso central

SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único (Single-nucleotide polymorphism)

UHRF1: ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domain 1

WAIS: Escala de inteligência Weschler para adultos

WMS-R: Escala de memória revisada de Weschler

Resumo da Dissertação

Introdução:

O déficit de memória associado ao envelhecimento não é considerado uma condição patológica, no entanto pode ser um fator prejudicial à qualidade de vida dos indivíduos acometidos. O estilo de vida, hábitos e fatores genéticos têm sido estudados como preditores do desempenho de memória.

Objetivos:

Investigar a influência de polimorfismos em *DNMT1* e *DNMT3B* sobre os escores de memória em voluntários acima dos 50 anos de idade.

Materiais e Métodos:

A amostra foi composta por 241 indivíduos avaliados de acordo com cinco tipos de memória episódica, utilizando a Escala de Memória de Wechsler (WMS-R). O DNA genômico foi extraído a partir de leucócitos do sangue periférico pelo método padrão de *salting-out* e os polimorfismos nos genes *DNMT1* e *DNMT3B* foram determinados por discriminação alélica com o ensaio da 5' nuclease, TaqMan®.

Resultados:

Não foi observada nenhuma diferença significativa entre a frequência genotípica dos polimorfismos estudados e a presença de déficit de memória. No entanto, encontramos uma associação estatisticamente significativa ($p=0,010$) entre baixos escores de memória de Aprendizado Verbal e homozigotos AA para o polimorfismo rs2424932 do gene *DNMT3B*.

Conclusão:

Polimorfismos em genes que codificam as DNMTs têm sido associados a um risco aumentado para o desenvolvimento de diversas neoplasias, mas estudos recentes também sugerem um papel importante dos mesmos nas funções de memória e distúrbios psiquiátricos. Nosso estudo foi o primeiro a descrever uma associação positiva entre um polimorfismo no gene *DNMT3B* e baixos escores de memória.

*“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará
ao seu tamanho original.”*

Albert Einstein

1. Introdução

1.1. Envelhecimento populacional

Atualmente, chegar à velhice é uma realidade populacional mesmo nos países subdesenvolvidos (Veras, 2009). No ano de 2000, aproximadamente 10% da população mundial era idosa, com previsão de crescimento acima de 20% para 2050. No Brasil, houve um rápido e intenso crescimento deste grupo etário, sendo que as pessoas com mais de 65 anos representavam 4,8% da população em 1991 e 5,8% em 2000. Em 2010, este número alcançou 7,4%, o que representa 19 milhões de pessoas (IBGE, 2010).

Considerando diversos fatores, é possível fazer uma projeção de crescimento desta faixa etária, com uma estimativa de que, em 2050, o Brasil contará com 65 milhões de pessoas idosas (IBGE, 2010). Este cenário poderá representar um aumento significativo no número de indivíduos com morbidades, incapacidades e com necessidade de utilização dos serviços de saúde (Veras, 2009).

O Rio Grande do Sul (RS) destaca-se dos demais estados brasileiros por apresentar um perfil epidemiológico e demográfico-sanitário diferenciado do nacional e similar ao dos países industrializados, com um expressivo número da população idosa (Jeckel Neto e Cruz, 2000). Segundo dados do censo demográfico, as regiões Sudeste e Sul do Brasil apresentam evolução semelhante da estrutura etária, mantendo-se como as duas regiões mais envelhecidas do país. Ambas apresentavam, em 2010, 8,1% da população formada por idosos com 65 anos ou mais, enquanto a proporção de crianças menores de 5 anos era, respectivamente, de 6,5% e 6,4% (IBGE, 2010).

Um aspecto relevante à população idosa está relacionado ao gênero. Assim como ocorre na distribuição da população total, as mulheres são a maioria entre os idosos. A maior diferença entre os dois sexos é evidenciada na faixa etária de 80 a 89 anos, na qual observa-se cerca de 12 mil mulheres a mais que homens (IBGE, 2010).

O envelhecimento é um processo natural na vida de todos os indivíduos. No entanto, ainda é considerado muito complexo pela ciência. Em termos biológicos, o envelhecimento pode ser definido como um declínio na habilidade de um organismo em responder a estímulos estressores, levando a uma disfunção na homeostasia e a um aumento na incidência de doenças (Parente e Wagner, 2006). É um processo dinâmico e progressivo, no qual ocorrem modificações morfológicas, funcionais e bioquímicas, tornando o indivíduo mais suscetível a fatores intrínsecos e extrínsecos que acabam por levá-lo à morte (Papaléo Netto, 1996).

O envelhecimento de cada indivíduo pode ser categorizado de três formas distintas: normal, saudável e patológico (Parente e Wagner, 2006). No envelhecimento normal, podem ocorrer doenças ou limitações físicas e/ou mentais, mas que são consideradas de risco leve a moderado e que não causam um impacto drástico e incapacitante nas atividades diárias. No envelhecimento saudável, também denominado senescência, ocorrem mudanças senis mantendo a qualidade da saúde física e mental e do bem-estar, funcionalmente similares a de adultos jovens saudáveis. Por fim, no envelhecimento patológico, também chamado de senilidade, ocorrem danos de maior gravidade que levam ao desenvolvimento de doenças, em geral, de caráter crônico e degenerativo (Cançado e Horta, 2006; Parente e Wagner, 2006).

Dentre os sistemas biológicos humanos, o sistema nervoso central (SNC) demonstra ser o mais afetado pelo processo de envelhecimento, o qual é acompanhado de declínio em algumas habilidades cognitivas, como a memória episódica e as funções executivas. Entretanto, apenas em alguns casos o declínio cognitivo evolui para a demência (Parente e Wagner, 2006; Paulo e Yassuda, 2010). As síndromes demenciais caracterizam-se pela presença de déficit progressivo na função cognitiva, especialmente na perda de memória e na presença de afasia, apraxia, agnosia ou perturbação do funcionamento executivo, com interferência nas atividades sociais e ocupacionais (Neto e cols., 2005; Holz e cols., 2013).

O envelhecimento normal engloba um declínio gradual nas funções cognitivas, dependentes de processos neurológicos que se alteram com a idade. As perdas de memória, principalmente as que cursam com dificuldade para recordar nomes, números de telefones e objetos guardados, são as que mais chamam a atenção e assustam pela possibilidade real ou presumida de que possam evoluir para demência. Na verdade, o declínio cognitivo que acompanha a idade tem início e progressão extremamente variáveis, dependendo de fatores educacionais, de saúde e de personalidade, bem como do nível intelectual global e capacidades mentais específicas do indivíduo (Canineu e cols., 2006).

1.2. A Memória

A memória é a função cerebral que permite ao indivíduo situar-se no presente levando em consideração o passado e o futuro, além de fornecer bases para todos os conhecimentos, habilidades, sonhos, planos e anseios, sendo, por consequência, um fator determinante do comportamento humano (Tomaz, 1993).

A memória é considerada, dentre todas as funções cognitivas, uma das mais importantes, sendo fundamental para o desenvolvimento da linguagem, da consciência de quem somos e do reconhecimento de pessoas e objetos (Yassuda, 2006).

Do ponto de vista biológico, a memória pode ser definida como a capacidade de aquisição, formação, armazenamento e evocação de informações (Izquierdo, 2004). Cada um destes processos é importante para a formação da memória, independente da classificação utilizada para avaliá-la. Apesar da quantidade e complexidade dos processos que envolvem sua formação, são usadas praticamente as mesmas regiões do cérebro e mecanismos moleculares semelhantes para a construção de memórias distintas (Izquierdo, 2002).

A primeira etapa para a formação da memória é a aquisição, também chamada de aprendizagem. Esta começa por volta dos 2 a 3 anos de idade, período no qual se aprende a executar ações básicas do cotidiano, como comer, beber, falar ou andar (Izquierdo, 2002; Izquierdo, 2004).

O armazenamento das informações adquiridas é a consolidação da memória. A memória individual necessita descartar o trivial. Ao longo dos anos, perdemos fatos, lembranças ou conhecimentos que não nos interessam. Este processo de armazenamento ocorre de maneira dinâmica e sistemática pelo cérebro, que é capaz de discernir, processar e segregar as informações relevantes daquelas que não possuem mais utilidade (Izquierdo, 2002).

A última etapa para a formação da memória é a evocação das informações retidas, também denominada de recordação, lembrança ou recuperação. Apenas as informações consideradas importantes que foram armazenadas podem ser recuperadas. Para a evocação destas informações é necessária uma reativação

das redes sinápticas envolvidas em cada memória específica (Izquierdo, 2002). Sob circunstâncias de estresse ou ansiedade excessiva, assim como pelo excesso de glicocorticóides no hipocampo ou na amígdala basolateral, podem ocorrer os chamados “brancos” de memória, que são considerados déficits associados à evocação de informações e que não afetam a memória consolidada, a qual permanece intacta, apenas não podendo ser expressa naquele momento (Izquierdo e Izquierdo, 2004).

As alterações de memória estão presentes no envelhecimento normal. No entanto, o desconhecimento da natureza exata destas alterações provoca dificuldades no diagnóstico diferencial e na possibilidade de realizar intervenções terapêuticas precoces (Parente e Wagner, 2006).

O déficit de memória associado ao envelhecimento foi descrito pela primeira vez em 1986 pelo *NIMH (National Institute of Mental Health)*, e não é considerado uma condição patológica (Crook e cols., 1986). A definição deste fenótipo clínico seria a perda subjetiva ou objetiva de memória associada ao envelhecimento, na ausência de demência, ou de qualquer outra condição clínica ou psicopatológica que pudesse explicar os problemas de memória. Os indivíduos que se encaixam nesta classe seriam aqueles com escores um desvio padrão abaixo da média em testes neuropsicológicos e acima dos 50 anos de idade (Parnetti e cols., 1996).

Outros critérios de inclusão estabelecidos para o diagnóstico de declínio de memória associado à idade, do inglês *age-associated memory impairment (AAMI)*, são: possuir intelecto suficiente para continuar produtivo, apresentar queixa de perda de memória progressiva e apresentar evidências objetivas de déficit de memória em testes específicos de desempenho. Entre os critérios de

exclusão para esse diagnóstico estão: perda severa de memória, similar à perda encontrada em pacientes com doença de Alzheimer (DA); outros tipos de demências conhecidas (vasculares, demência frontotemporal e demência dos corpos de Lewy), e algumas condições clínicas e psiquiátricas que poderiam levar ao comprometimento do desempenho de memória, como ansiedade e depressão (Crook e cols., 1986).

Embora estes critérios originalmente tenham sido estabelecidos para definir uma população de idade normal, atualmente existem evidências que sugerem que esta condição poderia representar um status intermediário entre o envelhecimento normal e o aparecimento de demência (Parnetti e cols., 1996).

A queixa de dificuldades com a memória é frequente entre idosos. Estudos realizados em outros países indicam que esse tipo de queixa é mais frequente entre as mulheres. Ao longo dos últimos anos, várias hipóteses foram testadas com o objetivo de explicar esse padrão de comportamento. A mais consistente entre elas é a que se refere à privação de estrogênio no climatério (Almeida e cols., 1993). Outras variáveis como viver só, não ser casado e apresentar nível educacional elevado também têm sido associadas com a maior frequência de dificuldade subjetiva com a memória (Almeida e cols., 1993; Hänninen e cols., 1996).

Nas pessoas de idade média, já se observam dificuldades de memória. Nos adultos mais velhos, isso se manifesta como uma vulnerabilidade da memória, ou seja, uma dificuldade para recordar nomes de objetos e de adquirir novos aprendizados. A memória de trabalho e as memórias explícitas são as mais afetadas com o envelhecimento (Parente e Wagner, 2006).

Um significativo número de fatores ambientais tem sido investigado como potencial fator de risco para o déficit de memória. Dentre eles, encontram-se os hábitos alimentares, o tabagismo, a atividade física e o nível educacional (Kalmijn e cols., 1997a; Kalmijn e cols., 1997b; Grant, 1999; Morris e cols., 2004).

Alguns estudos encontraram importantes associações entre a ingesta de algumas classes de alimentos e o risco aumentado de desenvolver problemas de memória, assim como um efeito protetor para outros alimentos. Exemplos de alimentos associados com um maior risco de comprometimento e declínio cognitivo foram os ricos em colesterol e gorduras saturadas; já a ingesta frequente de peixe mostrou ter um efeito protetor contra problemas cognitivos (Kalmijn e cols., 1997; Kalmijn e cols., 1997; Grant, 1999; Morris e cols., 2004). Além disto, tem sido sugerido que variações globais na dieta estejam relacionadas com a frequência de DA (Grant, 1997).

Outros fatores relacionados com o déficit de memória e a DA vêm sendo investigados e existe um consenso geral de que o uso regular das atividades cognitivas, além de níveis superiores de educação, possuiria um efeito protetor contra a DA. Algumas atividades sociais e de lazer envolvendo o uso das habilidades cognitivas podem ser protetoras contra a DA e outras formas de demência, enquanto outras atividades de lazer parecem não ter nenhum efeito protetor (Lindstrom e cols., 2005).

Além dos fatores externos, com o advento e aprimoramento de técnicas moleculares, existe um interesse crescente de determinar a influência que os genes apresentam neste contexto, podendo alguns marcadores genéticos estarem relacionados com as diferenças individuais de memória.

Investigações neste sentido começaram a ser descritas na literatura somente a partir de 2001 e alguns grupos encontraram associação entre diminuição de memória e a variabilidade em genes relacionados a diferentes funções, a saber: genes que codificam as apolipoproteínas E e C1 (*APOE* e *APOC1*) (Bartrés-Faz e cols., 2001a; Bartrés-Faz e cols., 2001b; Serra-Grabulosa e cols., 2003; Van Der Flier e cols., 2008), a enzima conversora de angiotensina (*ECA*) (Monastero e cols., 2002; Kolsch e cols., 2005; Schuch e cols., 2014), fator neurotrófico derivado do cérebro (*BDNF*) (Goldeberg e cols., 2008; Miyajima e cols., 2008) e receptores e transportadores do sistema serotoninérgico (*SLC6A4*, *HTR1A* e *HTR2A*) (Quervain e cols., 2003).

1.2.1. Classificação da memória

Existem diferentes formas de classificar a memória: de acordo com a sua função, com o tempo que duram e com o seu conteúdo (Izquierdo, 2002).

De acordo com a função, o principal tipo de memória é a de trabalho. Também chamada de operacional (Cançado e Horta, 2006), ela serve para manter durante alguns segundos, no máximo poucos minutos, a informação que está sendo processada no momento. A memória de trabalho diferencia-se das demais pelo fato de não deixar traços bioquímicos e não produzir arquivos (Izquierdo, 2002; Cançado e Horta, 2006).

A memória de trabalho é aquela que usamos para entender o que nos rodeia, envolve a percepção da realidade pelos sentidos e a formação ou evocação de memórias (Cançado e Horta, 2006). Pode ser melhor definida por meio de exemplos. Usamos a memória de trabalho, por exemplo, quando “conservamos” na consciência, por alguns segundos, a terceira palavra da frase

anterior (que, a estas alturas, já esquecemos). A retenção de tal palavra só serviu para conseguir entender essa frase, seu contexto e significado do que veio a seguir. Usamos a memória de trabalho quando perguntamos para alguém o número de telefone do dentista; conservamos esse número o tempo suficiente para discá-lo e, uma vez feita a comunicação correspondente, o esquecemos (Izquierdo, 2002).

A memória não constitui um constructo unitário, mas se apresenta dissociada em processos discretos. As descrições mais conhecidas consideram o componente temporal e estabelecem diferenças entre a memória de curto e de longo prazo (Parente e Wagner, 2006).

A memória de curto prazo, também denominada memória primária ou imediata, é capaz de operar com determinada informação durante um curto período, equivalente a poucas horas (Izquierdo, 2002; Parente e Wagner, 2006). A memória de curta duração requer as mesmas estruturas nervosas que a de longa duração, mas envolve mecanismos próprios e distintos (Izquierdo, 2002).

Já a memória de longo prazo, chamada também de memória secundária ou remota, é um sistema de capacidade ilimitada e pode armazenar as informações por tempo indeterminado, que pode durar muitos meses ou até anos (Izquierdo, 2002; Parente e Wagner, 2006).

De acordo com o seu conteúdo, as memórias podem ainda ser classificadas como declarativas e procedurais (Izquierdo, 2002).

As memórias que registram fatos, eventos ou conhecimento são chamadas declarativas, porque nós, os seres humanos, podemos declarar que existimos e podemos relatar como as adquirimos. Entre elas, as memórias referentes a eventos aos quais assistimos ou dos quais participamos, por exemplo lembranças

de nossa formatura ou de um rosto, são denominadas episódicas. Essas memórias são autobiográficas. Já as memórias de conhecimentos gerais, como nossos conhecimentos de português ou do perfume das rosas, são denominadas semânticas (Izquierdo, 2002).

Denominam-se memórias procedurais ou memórias de procedimentos aquelas de capacidades ou habilidades motoras ou sensoriais e que geralmente chamamos de “hábitos”. Exemplos típicos são as memórias de como andar de bicicleta, nadar, saltar, soletrar, etc. É difícil “declarar” que possuímos tais memórias; para demonstrar que as temos, devemos de fato andar de bicicleta, nadar, saltar ou soletrar (Izquierdo, 2002).

Ainda se pode dividir ambos os tipos de memória (declarativa e procedural) em explícitas e implícitas. As memórias de procedimento são em geral adquiridas de maneira implícita, mais ou menos automáticas e sem que o indivíduo perceba de forma clara que as está aprendendo. Muitas das memórias semânticas também são adquiridas de maneira inconsciente como, por exemplo, a língua de origem. As memórias adquiridas sem que o indivíduo perceba denominam-se implícitas. As memórias adquiridas com plena intervenção da consciência são chamadas explícitas (Izquierdo, 2002).

Para o estudo do envelhecimento humano, a distinção entre memória implícita e explícita é importante, pois a literatura cognitiva mostra que a memória implícita é bastante preservada com o passar da idade, enquanto a memória explícita é negativamente afetada. Isso significa que, quando idosos e jovens são comparados em testes de memória implícita, poucas diferenças são encontradas. Entretanto, em testes de memória explícita, como os testes de memória episódica, aparecem diferenças significativas a favor dos jovens (Yassuda, 2006).

Neste estudo, utilizou-se a classificação de Wechsler (1997), na qual é possível dividir a memória em cinco tipos: memória visual imediata e tardia, memória verbal imediata e tardia e memória de aprendizado verbal. A avaliação de memória verbal imediata consiste em observar a capacidade do indivíduo de se lembrar de fatos recentes, enquanto a memória verbal tardia observa a capacidade de se lembrar de fatos antigos. Já a memória visual imediata verifica a capacidade de recordar imagens recentes, enquanto a memória visual tardia verifica a capacidade de recordar imagens tardias. O teste de aprendizado verbal analisa a capacidade do indivíduo em armazenar novas informações.

Nos últimos 50 anos, geriatras e gerontólogos têm estudado intensamente os efeitos do envelhecimento sobre o funcionamento da memória humana. Dentre estes estudos, inúmeras mudanças no funcionamento da memória foram documentadas e são esperadas durante o envelhecimento saudável. Por exemplo, sabe-se hoje que a velocidade de processamento das informações, importantes para a formação de novos traços de memória, é menor nos adultos mais velhos do que nos jovens. Sabe-se também que, com o passar da idade, o declínio na memória para fatos, denominada memória episódica, é mais acentuado do que o declínio na memória semântica, utilizada para materiais linguísticos. Além disso, outra alteração bem aceita pelos pesquisadores é de que a memorização consciente, denominada memória explícita, é mais sensível aos efeitos do envelhecimento do que a memorização realizada inconscientemente, ou memória implícita (Yassuda e cols., 2005).

1.3. Epigenética, Metilação de DNA e Memória

A epigenética refere-se a um conjunto de modificações pós-traducionais de auto-perpetuação no DNA e em proteínas nucleares que produzem alterações duradouras na estrutura da cromatina como consequência direta, e alterações duradouras nos padrões de expressão gênica, como uma consequência indireta (Levenson e cols., 2006).

Estas modificações são reversíveis e herdáveis no genoma funcional, não alterando a sequência nucleotídica do DNA. Apesar das células somáticas de um mesmo organismo apresentarem material genético idêntico, elas exibem uma variedade de fenótipos, dando origem a diferentes células, tecidos e órgãos. A base destas diferenças reside no código epigenético (Bird, 2002).

A metilação do DNA é o mecanismo epigenético mais bem caracterizado, desempenhando um papel fundamental na regulação da expressão gênica e na promoção de importantes processos celulares, tais como a manutenção da estabilidade genômica, a inativação do cromossomo X, o *imprinting* genômico e o silenciamento gênico (Qureshi e Mehler, 2010; D'Urso e Brickner, 2014). Além da metilação do DNA, existem outros dois mecanismos principais de alterações epigenéticas: modificação de histonas e ação de RNAs não-codificadores (Bell e cols., 2011).

O processo de metilação de DNA é regulado pelas DNA metiltransferases (DNMTs), um grupo de enzimas que catalisa a transferência de grupos metil para resíduos de citosina na posição 5' do anel da pirimidina. Estes são seguidos por resíduos de guanina (dinucleotídeos CpG) dentro de uma fita contínua de DNA (Siedlecki e Zielenkiewicz, 2006; Bali e cols., 2011).

Estima-se que em torno de metade de todos os dinucleotídeos CpG no genoma são metilados e essa quantidade tende a aumentar com o envelhecimento. A metilação CpG ocorre na extremidade 5' do carbono de citosina em ambas as fitas de DNA complementar, alterando a estrutura da cromatina e regulando padrões específicos de expressão gênica (Bell e cols., 2011).

As DNMTs são responsáveis pela nova metilação e pela manutenção dos padrões de metilação durante a replicação do material genético (Bell e cols., 2011). O genoma humano contém três enzimas ativas: DNMT1, DNMT3A e DNMT3B (Dhe-Paganon e cols., 2011; Smith e Meissner, 2013).

A principal função da DNMT1, que é ativa no DNA hemimetilado, é assegurar a propagação e manutenção de padrões de metilação existentes, além de ser essencial para a regulação gênica e estabilidade da cromatina. O recrutamento de DNMT1 até o DNA hemimetilado é mediado através de sua interação com a enzima UHRF1 (*ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domain 1*), que é crucial no processo de transmissão fiel dos padrões de metilação do genoma. Já DNMT3A e DNMT3B são principalmente necessárias para nova metilação durante a embriogênese e desenvolvimento de células germinativas (Goll e Bestor, 2005; Haggarty e cols., 2010; Yu e cols., 2011) (Figura 1).

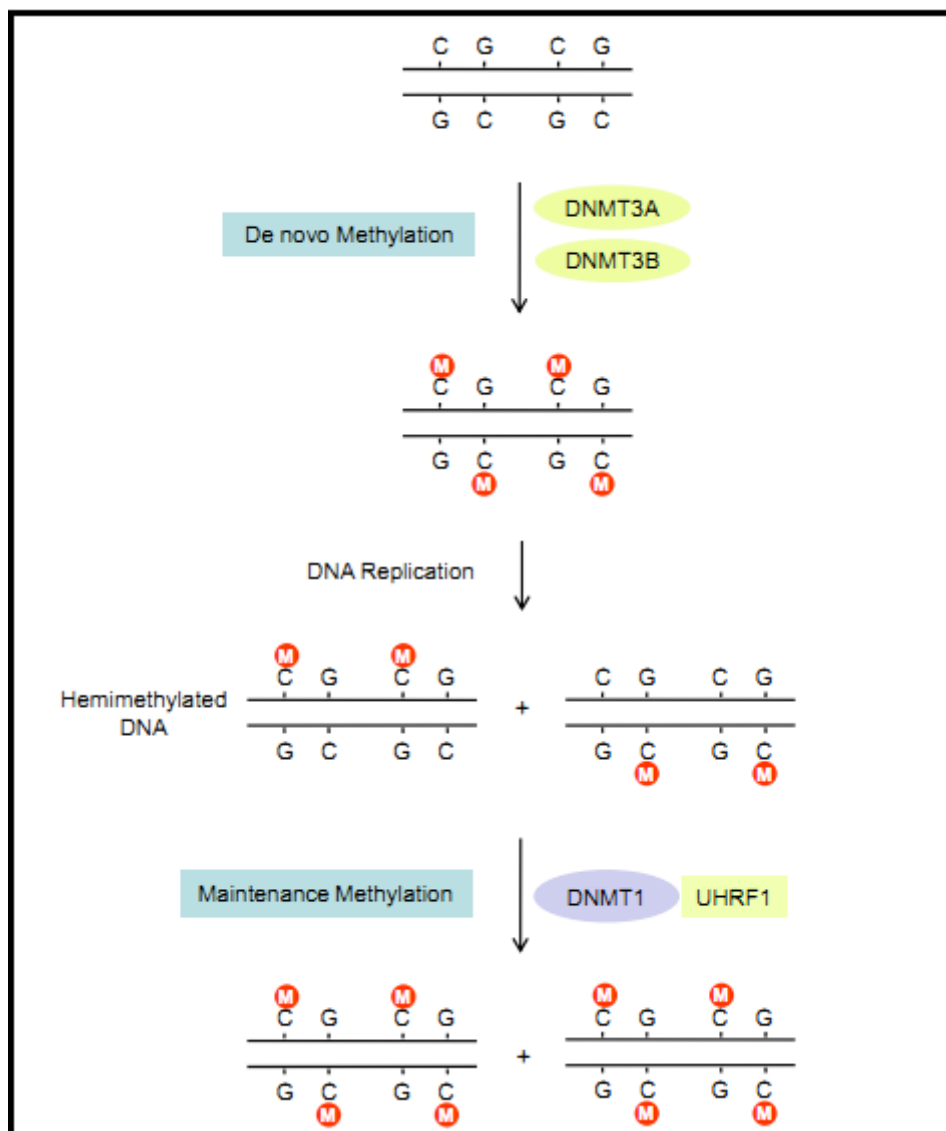


Figura 1. Visão geral da metilação do DNA em mamíferos (adaptado de Yu e cols., 2011).

Os três genes que codificam as DNMTs exibem perfis de expressão diferencial no SNC. A expressão de DNMT3B é observada em tecido neural progenitor apenas durante a embriogênese. DNMT3A é expressa a partir da embriogênese até a vida adulta, com um pico de expressão durante o período pós-natal recente e, em seguida, queda nos níveis. Contudo, continua a ser detectada nos neurônios pós-mitóticos no cérebro adulto (Yu e cols., 2011). A regulação anormal da expressão das DNMTs (DNMT1, DNMT3A e DNMT3B) tem

sido relacionada ao abuso de drogas, ao suicídio e a desordens psiquiátricas, como a esquizofrenia e o transtorno bipolar (Veldic e cols., 2004; Veldic e cols., 2005; Numachi e cols., 2007; Poulter e cols., 2008; LaPlant e cols., 2010; Saradalekshmi e cols., 2014).

A alteração no padrão de expressão gênica neuronal é necessária para a formação da memória de longo prazo ou para a plasticidade sináptica, que é a base da aprendizagem. Uma vez que a metilação de DNA está envolvida em mudanças na transcrição gênica induzidas pela atividade neural, pode ser considerada um processo molecular crítico para a plasticidade sináptica, além da formação e da manutenção da memória de longo prazo *in vivo* no sistema nervoso adulto (Miller e cols., 2008; Day e Sweatt, 2011; Yu e cols., 2011; Maddox e cols., 2014).

Levenson e cols. (2006) sugerem em seu trabalho que a metilação de DNA pode ter efeitos duradouros sobre a expressão gênica neuronal e o estado funcional global. Eles supõem que a modificação direta do DNA, na forma de metilação, seja um mecanismo epigenético para armazenamento de informações a longo prazo no SNC.

Alguns trabalhos científicos também mostram que o envelhecimento tem influência sobre os níveis de metilação do DNA como um todo, bem como sobre a metilação de genes específicos em uma variedade de tecidos, incluindo o cérebro. Estudos em humanos e roedores vêm demonstrando alterações relacionadas com a idade nos padrões de metilação do DNA no cérebro (Haberman e cols., 2012).

Feng e cols. (2010) verificaram em seus estudos que DNMT1 e DNMT3B são necessárias para a plasticidade sináptica, o aprendizado e a memória através

de seus papéis sobrepostos na manutenção da metilação do DNA e na modulação da expressão gênica em neurônios do SNC adulto. Estas evidências surgiram a partir de experimentos utilizando camundongos mutantes com deleções nos genes *DNMT1*, *DNMT3B* ou em ambos em neurônios excitatórios do prosencéfalo, os quais mostraram que apenas os camundongos com duplo nocaute apresentaram plasticidade anormal a longo prazo em região do hipocampo com déficit de aprendizado e de memória.

Além disso, estudos associaram mutações no gene *DNMT1* à neurodegeneração central e periférica em uma forma hereditária de neuropatia sensorial com sinais de demência e perda da audição, à síndrome de narcolepsia/catalepsia seguida por ataxia e à perda de memória (Klein e cols., 2011; Winkelmann e cols., 2012; Klein e cols., 2013).

1.3.1. DNA metiltransferases e a variabilidade genética

O gene *DNMT1* (*DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1*) está localizado no braço curto do cromossomo 19 (19p13.2) e duas variantes de transcritos que codificam diferentes isoformas foram encontradas para este gene (NCBI, 2014a). Muitos estudos têm buscado o associar à perda auditiva, à neuropatia sensorial, à demência e a alguns tipos de câncer (Klein e cols., 2011; Ikeda e cols., 2013; Klein e cols., 2013; Feng e cols., 2014; Li e cols., 2014).

Já o gene *DNMT3A* (*DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 alpha*) está localizado no braço curto do cromossomo 2 (2p23) e codifica uma proteína que se localiza no citoplasma e no núcleo. O *splicing* alternativo resulta em múltiplos transcritos variantes que codificam isoformas diferentes (NCBI, 2014b). Muitos estudos têm relacionado mutações neste gene com leucemia mielóide aguda (Lu

e cols., 2013; Tie e cols., 2014; Ibrahim e cols., 2015). O gene *DNMT3B* (*DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 beta*) está localizado no braço longo do cromossomo 20 (20q11.2) e a proteína codificada situa-se principalmente no núcleo. Oito variantes de transcritos foram descritas a partir do *splicing* alternativo (NCBI, 2014c).

Polimorfismos comuns nos genes *DNMTs* foram associados com aumento no risco para o desenvolvimento de diversos cânceres (Shen e cols., 2002; Lee e cols., 2005; Singal e cols., 2005; Hu e cols., 2010; Bao e cols., 2011; Lao e cols., 2013). Além disso, pesquisas recentes também sugerem um papel destes polimorfismos nas funções de memória, em distúrbios psiquiátricos e em doenças autoimunes (Zhang e cols., 2009; Haggarty e cols., 2010; Nam e cols., 2010; Coppédè e cols., 2012). No entanto, estudos investigando uma possível contribuição de polimorfismos e variantes de *DNMTs* para o risco de DA são escassos na literatura científica (Coppédè e cols., 2012; Pezzi e cols., 2014), e em nossa revisão não encontramos trabalhos que investigassem uma associação entre estes genes e o déficit de memória.

Os estudos de associação genética permitem identificar padrões de variabilidade gênica, através da análise de polimorfismos, produzindo uma segregação sistemática entre indivíduos com diferentes fenótipos. A expressão diferencial dessas variantes polimórficas sobre o fenótipo pode ser muito útil para identificação de processos biológicos específicos subjacentes às características normais em humanos, bem como às diferentes manifestações frente a patologias.

Neste trabalho, testamos a hipótese de que polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em genes envolvidos na regulação epigenética, mais especificamente envolvidos no mecanismo de metilação de DNA (*DNMT1* e

DNMT3B), possam estar associados com o declínio de memória associado ao envelhecimento. No gene *DNMT1* foram avaliados os SNPs rs2162560 (A>G) e rs759920 (A>G). No gene da *DNMT3B* foram avaliados os SNPs rs2424913 (C>T), rs998382 (G>A) e rs2424932 (G>A).

Um estudo recente do nosso grupo de pesquisa (Pezzi e cols., 2014) avaliou os mesmos polimorfismos em indivíduos com DA e encontrou uma associação do haplótipo TGG (rs2424913 – rs998382 – rs2424932) com o desenvolvimento da doença, justificando, deste modo, a importância de trabalhos como este.

1.4. Referências Bibliográficas

Almeida OP, Hill K, Howard R, O'brien J, Levy R. Demographic and clinical features of patients attending a memory clinic. *Int J Geriatr Psychiatry*. 1993;8:497-501.

Bali P, Im HI, Kenny PJ. Methylation, memory and addiction. *Epigenetics*. 2011 Jun;6(6): 671-4.

Bao Q, He B, Pan Y, Tang Z, Zhang Y, Qu L, et al. Genetic variation in the promoter of DNMT3B is associated with the risk of colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2011;26(9):1107-12.

Bartrés-Faz D, Clemente IC, Junqué C, Valveny N, López-Alomar A, Sánchez-Aldeguer J, et al. APOE and APOC1 genetic polymorphisms in age-associated memory impairment. *Neurogenetics*. 2001a Oct;3(4):215-9.

Bartrés-Faz D, Junqué C, Clemente IC, Serra-Grabulosa JM, Guardia J, López-Alomar A, et al. MRI and genetic correlates of cognitive function in elders with memory impairment. *Neurobiol Aging* 2001b May-Jun;22(3):449-59.

Bell JT, Pai AA, Pickrell JK, Gaffney DJ, Pique-Regi R, Degner JF, et al. DNA methylation patterns associate with genetic and gene expression variation in HapMap cell lines. *Genome Biol*. 2011;12:R10.

Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*. 2002;16:6-21.

Cançado FAX, Horta ML. Envelhecimento cerebral. In: Freitas EV de, et al. *Tratado de Geriatria e Gerontologia*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006. p. 194-211.

Canineu PR, Stella F, Samara AB. Transtorno cognitivo leve. In: Freitas EV de, et al. *Tratado de Geriatria e Gerontologia*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006. p. 252-9.

Coppedè F, Zitarosa MT, Migheli F, Lo Gerfo A, Bagnoli S, Dardano A, et al. DNMT3B promoter polymorphisms and risk of late onset Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res*. 2012;9(5):550-4.

Crook TH, Bartus RT, Ferris SH, Whitehouse P, Cohen GD, Gershon S. Age-associated memory impairment: proposed diagnostic criteria and measures of clinical change. Report of a National Institute of Mental Health work group. *Dev Neuropsychol*. 1986;2(4):261-76.

Day JJ, Sweatt JD. Epigenetic mechanisms in cognition. *Neuron*. 2011 Jun; 70(5):813–29.

Dhe-Paganon S, Syeda F, Park L. DNA methyl transferase 1: regulatory mechanisms and implications in health and disease. *Int J Biochem Mol Biol*. 2011;2(1):58-66.

D'Urso A, Brickner JH. Mechanisms of epigenetic memory. *Trends Genet*. 2014 Jun;30(6):230-6.

Feng J, Zhou Y, Campbell SL, Le T, Li E, Sweatt D, et al. Dnmt1 and Dnmt3a maintain DNA methylation and regulate synaptic function in adult forebrain neurons. *Nat Neurosci*. 2010 Apr;13(4):423-30.

Feng Y, Wang J, Wu Y, Feng X, Yu Y. Protein expressions of HDAC1 and DNMT1 in non-small-cell lung cancer and its clinical significance. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2014 Mar 4;94(8):596-8.

Goldeberg TE, Iudicello J, Russo C, Elvevåg B, Straub R, Egan MF, et al. BDNF Val66Met polymorphism significantly affects d' in verbal recognition memory at short and long delays. *Biolog Psych*. 2008 Jan;77(1):20-4.

Goll MG, Bestor TH. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem*. 2005;74:481-514.

Grant WB. Dietary links to Alzheimer's disease. *Alzheimer's Disease Rev*. 1997;2:42-55.

Grant WB. Dietary links to Alzheimer's disease: 1999 update. *J Alzheimers Dis*. 1999 Nov;1(4-5):197-201.

Haberman RP, Quigley CK, Gallagher M. Characterization of CpG island DNA methylation of impairment-related genes in a rat model of cognitive aging. *Epigenetics*. 2012 Sep;7(9):1008-19.

Haggarty P, Hoad G, Harris SE, Starr JM, Fox HC, Deary IJ, et al. Human intelligence and polymorphisms in the DNA methyltransferase genes involved in epigenetic marking. *PLoS ONE*. 2010 Jun;5:1-6.

Hänninen T, Koivisto K, Reinikainen KJ, Helkala EL, Soininen H, Mykkänen L, et al. Prevalence of ageing-associated cognitive decline in an elderly population. *Age Ageing*. 1996 May;25(3):201-5.

Holz AW, Nunes BP, Thumé E, Lange C, Facchini LA. Prevalência de déficit cognitivo e fatores associados entre idosos de Bagé, Rio Grande do Sul, Brasil. *Rev Bras Epidemiol*. 2013;16(4):880-8.

Hu J, Fan H, Liu D, Zhang S, Zhang F, Xu H. DNMT3B promoter polymorphism and risk of gastric cancer. *Dig Dis Sci*. 2010;55:1011-6.

Ibrahim L, Mahfouz R, Elhelw L, Abdsalam EM, Soliman R. Prognostic significance of DNMT3A mutations in patients with acute myeloid leukemia. *Blood Cells Mol Dis*. 2015 Jan;54(1):84-9.

Ikeda S, Imura J, Suzuki K. Protein expression, mRNA expression and gene amplification of DNA methyltransferase 1 in endometrial tumor tissues. *Mol Clin Oncol*. 2013 May;1(3):423-9.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Censo demográfico. Rio de Janeiro; 2010.

Izquierdo I. Memória. Porto Alegre: Artmed; 2002.

Izquierdo I. Questões sobre memória. São Leopoldo: Editora Unisinos; 2004.

Izquierdo I, Izquierdo LA. Neurobiologia da memória. In: Kapczinski F, et al. Bases biológicas dos transtornos psiquiátricos. 2 ed. Porto Alegre: Artmed; 2004.

Jeckel Neto EA, Cruz IBM. Aspectos biológicos e geriátricos do envelhecimento. Porto Alegre: EDIPUCRS; 2000.

Kalmijn S, Feskens EJ, Launer LJ, Kromhout D. Polyunsaturated fatty acids, antioxidants, and cognitive function in very old men. *Am J Epidemiol*. 1997a Jan;145(1):33-41.

Kalmijn S, Launer LJ, Ott A, Witteman JC, Hofman A, Breteler MM. Dietary fat intake and the risk of incident dementia in the Rotterdam Study. *Ann Neurol*. 1997b Nov;42(5):776-82.

Klein CJ, Botuyan MV, Wu Y, Ward CJ, Nicholson GA, Hammans S, et al. Mutations in DNMT1 cause hereditary sensory neuropathy with dementia and hearing loss. *Nat Genet*. 2011 Jun;43(6):595–600.

Klein CJ, Bird T, Ertekin-Taner N, Lincoln S, Hjorth R, Wu Y, et al. DNMT1 mutation hot spot causes varied phenotypes of HSAN1 with dementia and hearing loss. *Neurology*. 2013 Feb;26:824-8.

Kolsch H, Jessen F, Freymann N, Kreis M, Hentschel F, Maier W, et al. ACE I/D polymorphism is a risk factor of Alzheimer's disease but not of vascular dementia. *Neurosci Lett*. 2005 Mar;377(1):37-9.

Lao Y, Wu H, Zhao C, Wu Q, Qiao F, Fan H. Promoter polymorphisms of DNA methyltransferase 3B and risk of hepatocellular carcinoma. *Biomed Rep*. 2013;1:771-5.

LaPlant Q, Vialou V, Covington HE 3rd, Dumitriu D, Feng J, Warren BL, et al. Dnmt3a regulates emotional behavior and spine plasticity in the nucleus accumbens. *Nat Neurosci*. 2010 Sep;13(9):1137-43.

Lee SJ, Jeon HS, Jang JS, Park SH, Lee GY, Lee BH, et al. DNMT3B polymorphisms and risk of primary lung cancer. *Carcinogenesis*. 2005;26:403-9.

Levenson JM, Roth TL, Lubin FD, Miller CA, Huang IC, Desai P, et al. Evidence that DNA (cytosine-5) methyltransferase regulates synaptic plasticity in the hippocampus. *J Biol Chem*. 2006 Jun;281(23):15763-73.

Li M, Wang Y, Song Y, Bu R, Yin B, Fei X, et al. Aberrant DNA methyltransferase 1 expression in clear cell renal cell carcinoma development and progression. *Chin J Cancer Res*. 2014 Aug;26(4):371-81.

Lindstrom HA, Fritsch T, Petot G, Smyth KA, Chen CH, Debanne SM, et al. The relationships between television viewing in midlife and the development of Alzheimer's disease in a case-control study. *Brain Cogn*. 2005 Jul;58(2):157-65.

Lu Q, Chen Y, Wang H, Li Z. DNMT3A mutations and clinical features in Chinese patients with acute myeloid leukemia. *Cancer Cell Int*. 2013;13:1.

Maddox SA, Watts CS, Schafe GE. DNA methyltransferase activity is required for memory-related neural plasticity in the lateral amygdale. *Neurobiol Learn Mem*. 2014;107:93-100.

Miller CA, Campbell SL, Sweatt JD. DNA methylation and histone acetylation work in concert to regulate memory formation and synaptic plasticity. *Neurobiol Learn Mem*. 2008 May;89(4):599-603.

Miyajima F, Ollier W, Mayes A, Jackson A, Thacker N, Rabbitt P, et al. Brain-derived neurotrophic factor polymorphism val66met influences cognitive abilities in the elderly. *Genes Brain Behav*. 2008 Jun;7(4):411-7.

Monastero R, Caldarella R, Mannino M, Cefalù AB, Lopez G, Noto D, et al. Lack of association between angiotensin converting enzyme polymorphism and sporadic Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 2002 Dec;335(2):147-9.

Morris MC, Evans DA, Bienias JL, Tangney CC, Wilson RS. Dietary fat intake and 6-year cognitive change in an older biracial community population. *Neurology*. 2004 May;62(9):1573-9.

Nam EJ, Kim KH, Han SW, Cho CM, Lee J, Park JY, et al. The -283C/T polymorphism of the DNMT3B gene influences the progression of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 2010;30:1299-303.

Ncbi.nlm.nih.gov [homepage de Internet]. Rockville Pike: National Center for Biotechnology Information, U. S. National Library of Medicine [atualizada em 2014 Aug 7]. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1786>>. Acesso em 9 Aug, 2014a.

Ncbi.nlm.nih.gov [homepage de Internet]. Rockville Pike: National Center for Biotechnology Information, U. S. National Library of Medicine [atualizada em 2014

Aug 7]. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1788>>. Acesso em 9 Aug, 2014b.

Ncbi.nlm.nih.gov [homepage de Internet]. Rockville Pike: National Center for Biotechnology Information, U. S. National Library of Medicine [atualizada em 2014 Aug 7]. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1789>>. Acesso em 9 Aug, 2014c.

Neto JG, Tamelini MG, Forlenza OV. Diagnóstico diferencial das demências. *Rev Psiquiatr Clín.* 2005;32(3):119-30.

Numachi Y, Shen H, Yoshida S, Fujiyama K, Toda S, Matsuoka H, et al. Methamphetamine alters expression of DNA methyltransferase 1 mRNA in rat brain. *Neurosci Lett.* 2007 Mar;414(3):213-7.

Papaléo Netto, M. Gerontologia. São Paulo: Atheneu; 1996.

Parente MAMP, Wagner GP. Teorias abrangentes sobre envelhecimento cognitivo. In: Parente MAMP. *Cognição e envelhecimento*. Porto Alegre: ArtMed; 2006. p. 31-46.

Parnetti L, Lowenthal DT, Presciutti O, Pelliccioli GP, Palumbo R, Gobbi G, et al. 1H-MRS, MRI-based hippocampal volumetry, and 99mTc-HMPAO-SPECT in normal aging, age-associated memory impairment, and probable Alzheimer's disease. *J Am Geriatr Soc.* 1996;44(2):133-8.

Paulo DLV, Yassuda MS. Queixas de memória de idosos e sua relação com escolaridade, desempenho cognitivo e sintomas de depressão e ansiedade. *Rev Psiquiatr Clín.* 2010;37(1):23-6.

Pezzi JC, Ens CM, Borba EM, Schumacher-Schuh AF, de Andrade FM, Chaves ML, et al. DNA methyltransferase haplotype is associated with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2014;579C:70-4.

Poulter MO, Du L, Weaver IC, Palkovits M, Faludi G, Merali Z, et al. GABAA receptor promoter hypermethylation in suicide brain: implications for the involvement of epigenetic processes. *Biol Psychiatry.* 2008 Oct;64(8):645-52.

Qureshi IA, Mehler MF. Emerging role of epigenetics in stroke. *Arch Neurol.* 2010;67(11):1316-22.

Quervain DJF, Henke K, Aerni A, Coluccia D, Wollmer MA, Hock C, et al. A functional genetic variation of the 5-HT2a receptor affects human memory. *Nat Neurosci.* 2003 Nov;6(11):1141-2.

Saradalekshmi KR, Neetha NV, Sathyan S, Nair IV, Nair CM, Banerjee M. DNA methyl transferase (DNMT) gene polymorphisms could be a primary event in epigenetic susceptibility to schizophrenia. *PLoS ONE.* 2014 May;9(5):e98182.

Schuch JB, Constantin PC, da Silva VK, Korb C, Bamberg DP, da Rocha TJ, et al. ACE polymorphism and use of ACE inhibitors: effects on memory performance. *Age (Dordr)*. 2014 Jun;36(3):9646.

Serra-Grabulosa JM, Salgado-Pineda P, Junqué C, Solé-Padullés C, Moral P, López-Alomar A, et al. Apolipoproteins E and C1 and brain morphology in memory impaired elders. *Neurogenetics*. 2003 Apr;4(3):141-6.

Shen H, Wang L, Spitz MR, Hong WK, Mao L, Wei Q. A novel polymorphism in human cytosine DNA-methyltransferase-3B promoter is associated with an increased risk of lung cancer. *Cancer Res*. 2002;62:4992-5.

Siedlecki P, Zielenkiewicz P. Mammalian DNA methyltransferases. *Acta Biochim Pol*. 2006; 53(2): 245-56.

Singal R, Das PM, Manoharan M, Reis IM, Schlesselman JJ. Polymorphisms in the DNA methyltransferase 3b gene and prostate cancer risk. *Oncol Rep*. 2005;14:569-73.

Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet*. 2013;14:204-20.

Tie R, Zhang T, Fu H, Wang L, Wang Y, He Y, et al. Association between DNMT3A mutations and prognosis of adults with de novo acute myeloid leukemia: a systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*. 2014 Jun;9(6):e93353.

Tomaz C. Psicobiologia da memória. *Psicologia USP*. 1993;4(1/2):49-59.

Van Der Flier WM, Pijnenburg YA, Schoonenboom SN, Dik MG, Blankenstein MA, Scheltens P. Distribution of APOE genotypes in a memory clinic cohort. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2008;25(5):433-8.

Veldic M, Caruncho HJ, Liu WS, Davis J, Satta R, Grayson DR, et al. DNA-methyltransferase 1 mRNA is selectively overexpressed in telencephalic GABAergic interneurons of schizophrenia brains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:348-53.

Veldic M, Guidotti A, Maloku E, Davis JM, Costa E. In psychosis, cortical interneurons overexpress DNA-methyltransferase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Feb;102(6):2152-7

Veras R. Envelhecimento populacional contemporâneo: demandas, desafios e inovações. *Rev Saúde Pública*. 2009;43(3):548-54.

Wechsler D. WAIS-III: Escala de inteligência Wechsler para adultos. WMS-III: Escala de memória Wechsler - manual técnico. Trad. Maria Cecília de Vilhena Moraes Silva. São Paulo: Casa do Psicólogo; 2004.

Winkelmann J, Lin L, Schormair B, Kornum BR, Faraco J, Plazzi G, et al. Mutations in DNMT1 cause autosomal dominant cerebellar ataxia, deafness and narcolepsy. *Hum Mol Genet*. 2012 May;21(10):2205–10.

Yassuda MS, Lasca VB, Neri AL. Meta-memória e auto-eficácia: um estudo de validação de instrumentos de pesquisa sobre memória e envelhecimento. *Psicologia: Reflexão e Crítica*. 2005;18(1):78-90.

Yassuda MS. Memória e envelhecimento saudável. In: Freitas EV de, et al. *Tratado de Geriatria e Gerontologia*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006. p. 1245-51.

Yu NK, Baek SH, Kaang BK. DNA methylation-mediated control of learning and memory. *Mol Brain*. 2011;4:1-9.

Zhang C, Fang Y, Xie B, Cheng W, Du Y, Wang D, et al. DNA methyltransferase 3B gene increases risk of early onset schizophrenia. *Neurosci Lett*. 2009;462:308-11.

2. Objetivos

Tendo em vista a atual tendência da maior expectativa de vida e o consequente envelhecimento da população em geral, observa-se um crescente aumento no número de casos de déficit de memória e de DA no país e no mundo. Assim, estudos como este são de extrema relevância para o conhecimento científico.

Além disso, o número de trabalhos descritos na literatura investigando a participação genética nos escores e no déficit de memória ainda é escasso. Provavelmente, a explicação para tal fato é que existe um interesse maior na influência de genes sobre fenótipos extremos, como a DA, enquanto características consideradas mais brandas, como o déficit de memória associado ao envelhecimento, são a princípio negligenciadas.

Escores de memória possuem influência multifatorial, com participação de fatores ambientais e genéticos. Assim, o objetivo geral deste trabalho foi investigar a associação entre polimorfismos em genes que codificam enzimas DNA metiltransferases e a suscetibilidade para diferenças nos escores e no déficit de memória.

2.1. Objetivos específicos

- ✓ Determinar a frequência dos polimorfismos rs2162560 (A>G) e rs759920 (A>G) do gene *DNMT1* em indivíduos com idade superior a 50 anos.
- ✓ Determinar a frequência dos polimorfismos rs2424913 (C>T), rs998382 (G>A) e rs2424932 (G>A) do gene *DNMT3B* em indivíduos com idade superior a 50 anos.

- ✓ Avaliar a influência dos polimorfismos rs2162560 (A>G) e rs759920 (A>G) do gene *DNMT1* sobre os escores de memória.
- ✓ Avaliar a influência dos polimorfismos rs2424913 (C>T), rs998382 (G>A) e rs2424932 (G>A) do gene *DNMT3B* sobre os escores de memória.

3. Artigo científico redigido em inglês

***DNMT1 and DNMT3B* gene polymorphisms: a possible role on memory**

Artigo científico redigido de acordo com as normas da revista:
AGE - The Official Journal of the American Aging Association
(<http://www.springer.com/life+sciences/cell+biology/journal/11357>)

DNMT1 and DNMT3B gene polymorphisms: a possible role on memory

Luana Pretto¹, Tatiane Jacobsen da Rocha¹, Andréa Guedes Machado², Luciana Alves Tisser³, Alcyr Alves de Oliveira Junior², Analuiza Camozzato⁴, Fabiana Michelsen de Andrade^{3,5}, Marilu Fiegenbaum^{1,*}

¹ Graduate Program in Pathology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)

² Psychology Department, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)

³ Institute of Human Sciences, Letters and Arts, Universidade Feevale

⁴ Graduate Program in Health Science, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)

⁵ Institute of Health Sciences, Universidade Feevale

*Corresponding author:

Marilu Fiegenbaum

Programa de Pós-Graduação em Patologia

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)

Sarmento Leite, 245 sala 403

CEP 90050-170 – Porto Alegre - RS

E-mail: mariluf@ufcspa.edu.br

Telefone: +55 51 33038773

Fax: + 55 51 33038810

ABSTRACT

Memory deficits associated with aging are not considered a pathological condition, but may impair the health and life quality. Life style, habits and genetic factors have been studied as predictors of memory performance. *DNMTs* gene polymorphisms have been associated with increased risk for several cancers, but recent studies also suggest a role in Alzheimer disease and psychiatric disorders. Our aim was to investigate whether SNPs in *DNMT1* and *DNMT3B* influence memory scores in volunteers over 50-year-old. The sample consisted of 241 subjects assessed for five types of episodic memory, using Wechsler Memory Scale-Revised (WMS-R) and Rey Auditory Verbal Learning Test (RALVT). Genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes through a standard salting-out procedure and SNPs of *DNMT1* and *DNMT3B* genes were determined by allelic discrimination with TaqMan 5' nuclease assays. We found no difference in genotype frequency between the investigated gene polymorphisms and presence of memory deficits. However, we verified a statistically significant association ($p=0.01$) between lower learning ability scores and AA homozygotes for *DNMT3B* rs2424932 SNP. This is the first study to describe a positive relationship between *DNMT3B* polymorphisms and lower memory scores.

Keywords: aging; memory scores; *DNMT1*; *DNMT3B*; polymorphisms

1. Introduction

Memory deficits associated with aging were first described in 1986 by the National Institute of Mental Health (NIMH) and they are not considered a pathological condition (Crook et al. 1986). Individuals who fall into this class are those with scores one standard deviation below the mean on neuropsychological tests and over 50 years of age. Although these criteria were originally established to define a population of normal aging, there is evidence to suggest that this condition could represent an intermediate status between normal aging and onset of dementia (Parnetti et al. 1996).

A significant number of environmental factors has been investigated as potential risk factors for memory deficits. Among these factors are eating habits, smoking, physical activity and educational level (Kalmijn et al. 1997a; Kalmijn et al. 1997b; Grant 1999; Morris et al. 2004). Besides these external factors, with the advent and improvement of molecular techniques there is growing interest to determine the influence of genes in this context, once some genetic markers may be related to individual memory differences.

DNA methylation is the best characterized epigenetic mechanism, playing a key role in regulation of gene expression and promotion of important cellular processes such as maintenance of genomic stability, X-chromosome inactivation and genomic imprinting (Qureshi and Mehler 2010). Epigenetic refers to any inheritable and reversible changes in the genome that do not alter the functional DNA nucleotide sequence. The DNA methylation process is mediated by DNA methyltransferases (DNMTs), which are enzymes responsible for new methylation and maintenance of DNA methylation patterns during replication (Bell et al. 2011).

The human genome contains three active enzymes: DNMT1, DNMT3a and DNMT3B (Dhe-Paganon et al. 2011).

Scientific evidence shows that aging has an influence on the levels of DNA methylation as a whole, as well as methylation of specific genes in a variety of tissues, including brain. Studies in humans and rodents have shown age-related changes in DNA methylation patterns in brain (Haberman et al. 2012). More recently, some scientific studies have reported that DNA methylation is also important for synaptic plasticity and formation and maintenance of memory in the adult nervous system (Miller et al. 2008; Yu et al. 2011). In addition, studies have linked mutations in *DNMT1* gene with central and peripheral neurodegeneration in an inherited form of sensory neuropathy with signs of dementia and hearing loss, and in a syndrome of narcolepsy/cataplexy followed by ataxia and loss of memory (Klein et al. 2011; Winkelmann et al. 2012).

Despite evidence linking changes in DNA methyltransferases to neurological disorders, to date, there are few reports in literature and none study has shown a clear association between polymorphisms in genes coding for DNMTs and memory deficits. Therefore, the aim of this study was to investigate whether SNPs in *DNMT1* and *DNMT3B* influence memory scores in volunteers over 50-year-old.

2. Methodology

2.1. Study design and subjects

The sample was composed of men and women with a minimum age of 50 years according to the inclusion criteria for memory decline associated with age determined by the National Institute of Mental Health (NIMH). The volunteers were

recruited through advertisements and interviewed at Feevale University and Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (Rio Grande do Sul, Brazil). This cross-sectional study involved collecting blood, dietary intake and lifestyle informations, and performance of neurocognitive tests for memory. The volunteers were asked about the occurrence of neurological disease, or psychiatric disorders, and use of anxiolytic drugs. Beck Depression and Anxiety Inventories and Lipp Inventory of stress were used in order to exclude volunteers who presented the symptoms. Volunteers were also excluded when presented lower estimate intellectual function (QI) ≤ 70 .

After completion of the exclusion criteria described, 241 subjects remained on the study. Other characteristics of this sample can be found in Schuch et al. (2014) and da Rocha et al. (2014).

2.2. Neuropsychological Measures

Evaluations of verbal and visual memory were performed using the Weschler Memory Scale-Revised, WMS-R (Weschler 2004). According to this scale, measures of four memories are computed, which consisted of the evaluation of immediate visual and verbal memories and delayed visual and verbal memories. The final data of each test is transformed into standard deviations of mean of each expected age, resulting in a range from - 4 to + 4. Memory deficit is considered only when scores are below -1. This means that individuals who have values equal or below -1 show disorders in forming the specific memory or learning ability. To assess verbal learning and ability to store new information, Rey Auditory Learning Verbal Test (RALVT) was used. Scores were computed in accordance with age, just as the testing battery WMS-R. Evaluations lasted an

average of 1 hour and were conducted by psychology students trained and supervised by professors from both universities.

2.3. DNA extraction and genotyping

Genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes through a standard salting-out procedure (Lahiri and Nuerberger 1991). SNPs rs2162560 (A>G) and rs759920 (A>G) of *DNMT1* gene and rs2424913 (C>T), rs998382 (G>A) and rs2424932 (G>A) of *DNMT3B* gene were determined by allelic discrimination with TaqMan 5' nuclease assays (Real Time PCR, Applied Biosystems, California, USA). For each reaction plate, genomic control DNA samples and non-template controls (water) were included. A control on the TaqMan SNP genotyping assay was also performed (25% of randomly chosen samples from both groups) to check for genotyping accuracy.

2.4. Statistical analysis

Continuous variables were expressed as mean $\pm$ standard deviation. Allele frequencies were estimated by gene counting. The agreement of genotype frequencies with Hardy-Weinberg equilibrium expectations was tested using chi-square tests. Genotype distributions between groups (normal or deficit) were compared by chi-square or Fisher's exact test. Evaluation of *DNMT1* and *DNMT3* genotypes on specific memory scores (immediate and delayed verbal memories, immediate and delayed visual memories and learning ability test) was tested using General Linear Models (ANOVA), with sex and schooling as covariates. The linkage disequilibrium between the polymorphisms in each genomic region was estimated with MLocus 3.0 (Long et al. 1995), and haplotypes were imputed with

PHASE 2.1 (Stephens et al. 2001; Stephens and Scheet 2005). Haplotypes with frequencies less than 3% were pooled. Values of $p < 0.05$ were considered significant. Statistical analysis was performed using SPSS19.0 for Windows®.

3. Results

3.1. Characteristics of study population

The average memory scores and socio-demographic and lifestyle characteristics of the study population are described in Table 1. After exclusion criteria, 241 subjects remained on the study, with a mean age of 63.27 ± 7.87 years. Most were women 77.7%. Overall, deficit on immediate verbal, delayed verbal, immediate visual and delayed visual memories were observed in 16.9%, 9.5%, 22.3% and 27.3% of the subjects, respectively. Deficit in the learning ability test was verified in 22.7% of the sample.

3.2. Allele, genotype and haplotype frequencies

Genotype, allele and haplotype frequencies for the SNP set are shown in Table 2. The genotype frequencies observed did not show statistically significant differences compared to those expected under Hardy–Weinberg equilibrium. The observed allele frequencies in this study were similar to those reported in SNP databases (Entrez SNP and International HapMap Project) and previous studies analyzing European or European-derived populations. For both genes, polymorphisms were in strong linkage disequilibrium ($D' > 0.8$ and $P < 0.001$ in all comparisons) and the respective haplotypes were subsequently assessed.

3.3 Association of *DNMT1* and *DNMT3B* gene polymorphisms with memory deficit and memory scores

We found no difference in genotype frequency between investigated gene polymorphisms and presence of memory deficits (data not shown). After adjustment of each specific kind of memory for schooling and sex, AA homozygotes for *DNMT3B* rs2424932 SNP showed lower scores of learning ability (-0.57 ± 1.21) than AG heterozygotes ($+0.11 \pm 1.26$) and GG homozygotes (-0.01 ± 1.18 , ANOVA $p=0.010$). We also observed that *DMT3B* rs2424932 was associated with long term verbal memory (AA, -0.09 ± 0.53 ; AG, $+0.14 \pm 0.67$; GG, -0.06 ± 0.59 , $p=0.036$). *DNMT1* SNPs, and *DNMT3B* rs2424913 and rs998382 were not associated with memory scores (Table 3). Additionally, we also compare memory score among *DNMT1* and *DMNT3B* haplotypes. For *DMNT3B*, homozygotes for CAA haplotype had lower scores of learning ability than carriers of other haplotypes combinations (-0.54 ± 1.25 vs. 0.03 ± 1.23 , $p=0.019$).

4. Discussion

Cognitive decline, especially in memory performance, is a normal part of aging. This deterioration is particularly pronounced in declarative memory - the ability to recall facts and experiences - and has been associated with abnormal changes in gene expression in hippocampus and frontal lobe of brain. However, the molecular mechanisms underlying these changes in gene regulation are not currently known (Sweatt 2010).

Life style is another factor producing individual differences in memory ability (Nilsson et al. 2002). Christensen et al. (1996) demonstrated strong cross-sectional evidence for a positive correlation between engagement in social,

cognitive, and physical activities and memory performance in old age. In a longitudinal study, Hultsch et al. (1999) also found a positive correlation between intellectually stimulating activities and memory performance. However, the authors were not able to demonstrate a causal relationship.

Epigenetic modifications provide likely candidates to modulate cognitive aging outcomes as both genetic and non-genetic factors impact cognitive status in elderly (Deary et al. 2004). Several epigenetic modifications, such as histone acetylation and genomic DNA methylation, play important roles in regulating gene expression during memory formation in multiple brain regions (Day and Sweatt 2011).

DNA methylation is catalyzed by DNA methyltransferases, which add a methyl moiety to the cytosine located within CpG dinucleotides. The establishment of normal DNA methylation is essential for development, and DNA methylation abnormalities are frequently associated with tumorigenesis and cell aging. However, the exact function of DNA methylation in learning and memory remains elusive despite that multiple studies on neurological disorders, such as Rett syndrome, suggest that abnormal methylation events are linked with neurological disorders and defective memory function (Liu et al. 2009).

DNMTs gene polymorphisms have been associated with increased risk of several cancers (Shen et al. 2002; Lee et al. 2005; Singal et al. 2005; Hu et al. 2010; Bao et al. 2011), but recent studies also suggest a role in memory functions, psychiatric disorders and autoimmune diseases (Zhang et al. 2009; Haggarty et al. 2010; Nam et al. 2010). Recent studies have investigated a possible correlation between DNA methylation and *DNMTs* gene polymorphisms and Alzheimer's disease (AD) (Scarpa et al. 2006; Mastroeni et al. 2011; Coppedè et al. 2012;

Pezzi et al. 2014). However, studies involving memory deficit, condition that could represent an intermediate status between normal aging and onset of dementia, are scarce in literature. Probably, the explanation for this fact would be a greater interest in the influence of genes on extreme phenotypes, such as AD, while milder characteristics, as memory deficits associated with aging, are neglected.

The aim of this study was to investigate whether SNPs in *DNMT1* and *DNMT3B* influence memory scores in volunteers over 50-year-old. We found a statistically significant association ($p=0.010$) between lower learning ability scores and AA homozygotes for *DNMT3B* rs2424932 SNP. Recently, our research group evaluated the association of same polymorphisms in *DNMT1* and *DNMT3B* genes with healthy aging and AD. Two of the five polymorphisms presented a significant difference in genotypic frequencies, both in *DNMT3B* gene. The rs998382 (*DNMT3B*) was significantly associated to AD, since individuals carrying the G allele (GG and GA genotypes) were 4 times more likely to develop AD (OR=4.0, 95% CI 1.6 to 9.8, $p=0.003$). For the rs2424913 polymorphism (also in *DNMT3B* gene), participants carrying the T allele (CT and TT genotypes) were 4.2 times more likely to develop AD (OR=4.2, 95% CI 1.6 to 10.8, $p=0.003$). In both polymorphisms of *DNMT1*, no significant difference between AD and control group was observed (Pezzi et al. 2014).

Independently of the polymorphisms analyzed, our study found a statistically significant association between *DNMT3B* gene and memory scores. Positive association of this gene with AD have been described (Pezzi et al. 2014). Thus, we infer a possible involvement of this gene as a memory modulator.

Learning ability is a kind of memory that assesses recent memory, verbal learning and ability to store new information. Our study found a worse

performance for this skill in AA homozygotes for *DNMT3B* rs2424932 SNP. Furthermore, we found a statistically significant association between this same polymorphism and long term verbal memory.

Pezzi et al. (2014) found that TGG haplotype (rs2424913 – rs998382 – rs2424932) in the *DNMT3B* gene showed significant association with AD. In contrast, in our study we found that homozygotes for CAA haplotype had lower scores of learning ability than carriers of other haplotypes combinations (-0.54 ± 1.25 vs. 0.03 ± 1.23 , $p=0.019$). Curiously, this "inversion" of results may lie in the differences in epigenetic molecular mechanisms involved in both conditions, which do not alter the protein coding, but that may be influencing in the modulation of brain aging and memory impairment.

This study is one of the first to describe a positive relationship between *DNMT3B* polymorphisms and lower memory scores. Therefore, further studies about the role of DNA methylation in memory performance are required, once they could be used in future as a target of prevention and prognosis of aged associated memory impairment, improving health and life quality in aging.

References

- Bao Q, He B, Pan Y, Tang Z, Zhang Y, Qu L, Xu Y, Zhu C, Tian F, Wang S. (2011) Genetic variation in the promoter of DNMT3B is associated with the risk of colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 26:1107-1112. doi: 10.1007/s00384-011-1199-3
- Bell JT, Pai AA, Pickrell JK, Gaffney DJ, Pique-Regi R, Degner JF, Gilad Y, Pritchard J (2011) DNA methylation patterns associate with genetic and gene expression variation in HapMap cell lines. *Genome Biol* 12:R10. doi: 10.1186/gb-2011-12-1-r10
- Christensen H, Korten A, Jorm AF, Henderson AS, Scott R, Mackinnon AJ (1996) Activity levels and cognitive functioning in an elderly community sample. *Age Ageing* 25:72–80.

- Coppedè F, Zitarosa MT, Migheli F, Gerfo AL, Bagnoli S, Dardano A, Nacmias B, Mancuso M, Monzani F, Siciliano G, Sorbi S, Migliore L (2012) DNMT3B Promoter Polymorphisms and Risk of Late Onset Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res* 9:550-554. doi: 10.2174/156720512800618062
- Crook TH, Bartus RT, Ferris SH, Whitehouse P, Cohen GD, Gershon S (1986) Age-associated memory impairment: proposed diagnostic criteria and measures of clinical change-report of a National Institute of Mental Health work group. *Dev Neuropsychol* 2:261-276.
- da Rocha TJ, Blehm CJ, Bamberg DP, Fonseca T, Tisser LA, de Oliveira Junior A, de Andrade FM, Fiegenbaum M (2014) The effects of interactions between selenium and zinc serum concentration and SEP15 and SLC30A3 gene polymorphisms on memory scores in a population of mature and elderly adults. *Genes Nutr* 9:377. doi: 10.1007/s12263-013-0377-z.
- Day JJ, Sweatt JD (2011) Epigenetic mechanisms in cognition. *Neuron* 70:813-829. doi: 10.1016/j.neuron.2011.05.019.
- Deary IJ, Wright AF, Harris SE, Whalley LJ, Starr JM (2004) Searching for genetic influences on normal cognitive ageing. *Trends Cogn Sci* 8:178-184. doi: 10.1016/j.tics.2004.02.008
- Dhe-Paganon S, Syeda F, Park L (2011) DNA methyl transferase 1: regulatory mechanisms and implications in health and disease. *Int J Biochem Mol Biol* 2:58-66.
- Grant WB (1999) Dietary links to Alzheimer's disease: 1999 update. *J Alzheimers Dis* 1:197-201.
- Haberman RP, Quigley CK, Gallagher M (2012) Characterization of CpG island DNA methylation of impairment-related genes in a rat model of cognitive aging. *Epigenetics* 7:1008-1019. doi: 10.4161/epi.21291
- Haggarty P, Hoad G, Harris SE, Starr JM, Fox HC, Deary IJ, Whalley LJ (2010) Human intelligence and polymorphisms in the DNA methyltransferase genes involved in epigenetic marking. *PLoS One* 5:e11329. doi: 10.1371/journal.pone.0011329
- Hu J, Fan H, Liu D, Zhang S, Zhang F, Xu H (2010) DNMT3B promoter polymorphism and risk of gastric cancer. *Dig DisSci* 55:1011-1016. doi: 10.1007/s10620-009-0831-3
- Hultsch DF, Hertzog C, Small BJ, Dixon RA (1999) Use it or lose it: engaged lifestyle as a buffer of cognitive decline in aging? *Psychol Aging* 14:245-263. doi: 10.1037/0882-7974.14.2.245
- Kalmijn S, Feskens EJ, Launer LJ, Kromhout D (1997a) Polyunsaturated fatty acids, antioxidants, and cognitive function in very old men. *Am JEpidemiol* 145:33-41.

- Kalmijn S, Launer LJ, Ott A, Witteman JC, Hofman A, Breteler MM (1997b) Dietary fat intake and the risk of incident dementia in the Rotterdam Study. *Ann Neurol* 42:776-782.
- Klein CJ, Botuyan MV, Wu Y, Ward CJ, Nicholson GA, Hammans S, Hojo K, Yamanishi H, Karpf AR, Wallace DC, Simon M, Lander C, Boardman LA, Cunningham JM, Smith GE, Litchy WJ, Boes B, Atkinson EJ, Middha S, B Dyck PJ, Parisi JE, Mer G, Smith DI, Dyck PJ (2011) Mutations in DNMT1 cause hereditary sensory neuropathy with dementia and hearing loss. *Nat Genet* 43:595–600. doi: 10.1038/ng.830
- Lahiri DK, Nurnberg JL (1991) A rapid non-enzymatic method for preparation of HMW DNA from blood for RFPL studies. *Nucleic Acids Res* 19:5444.
- Lee SJ1, Jeon HS, Jang JS, Park SH, Lee GY, Lee BH, Kim CH, Kang YM, Lee WK, Kam S, Park RW, Kim IS, Cho YL, Jung TH, Park JY (2005) DNMT3B polymorphisms and risk of primary lung cancer. *Carcinogenesis* 26:403-409. doi: 10.1093/carcin/bgh307
- Liu L, van Groen T, Kadish I, Tollefsbol TO (2009) DNA methylation impacts on learning and memory in aging. *Neurobiol Aging* 30:549-560. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2007.07.020
- Long JC, Williams RC, Urbanek M (1995) An E-M algorithm and testing strategy for multiple-locus haplotypes. *Am J Hum Genet* 56:799-810.
- Mastroeni D, Grover A, Delvaux E, Whiteside C, Coleman PD, Rogers J (2011) Epigenetic mechanisms in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 32:1161-1180. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2010.08.017
- Miller CA, Campbell SL, Sweatt JD (2008) DNA methylation and histone acetylation work in concert to regulate memory formation and synaptic plasticity. *Neurobiol Learn Mem* 89:599-603. doi: 10.1016/j.nlm.2007.07.016
- Morris MC, Evans DA, Bienias JL, Tangney CC, Wilson RS (2004) Dietary fat intake and 6-year cognitive change in an older biracial community population. *Neurology* 62:1573-1579.
- Nam EJ, Kim KH, Han SW, Cho CM, Lee J, Park JY, Kang YM (2010) The -283C/T polymorphism of the DNMT3B gene influences the progression of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 30:1299-303. doi: 10.1007/s00296-009-1141-y
- Nilsson L, Nyberg L, Bäckman L (2002) Genetic variation in memory functioning. *Neurosci Biobehav Rev* 26:841-848. doi: 10.1016/S0149-7634(02)00070-2

- Parnetti L, Lowenthal DT, Presciutti O, Pelliccioli GP, Palumbo R, Gobbi G, Chiarini P, Palumbo B, Tarducci R, Senin U (1996) 1H-MRS, MRI-based hippocampal volumetry, and 99mTc-HMPAO-SPECT in normal aging, age-associated memory impairment, and probable Alzheimer's disease. *J Am Geriatr Soc* 44:133-138.
- Pezzi JC, Ens CM, Borba EM, Schumacher-Schuh AF, de Andrade FM, Chaves ML, Fiegenbaum M, Camozzato AL (2014). DNA methyltransferase haplotype is associated with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 579C:70-74.
- Qureshi IA, Mehler MF (2010) Emerging Role of Epigenetics in Stroke Part 1: DNA Methylation and Chromatin Modifications. *Arch Neurol* 67:1316-1322. doi: 10.1001/archneurol.2010.275
- Scarpa S, Cavallaro RA, D'Anselmi F, Fuso A (2006) Gene silencing through methylation: An epigenetic intervention on Alzheimer disease. *J Alzheimers Dis* 9:407-414.
- Schuch JB, Constantin PC, da Silva VK, Korb C, Bamberg DP, da Rocha TJ, Fiegenbaum M, de Oliveira Jr A, Tisser LA, de Andrade FM (2014) ACE polymorphism and use of ACE inhibitors: effects on memory performance. *AGE*. doi: 10.1007/s11357-014-9646-z
- Shen H, Wang L, Spitz MR, Hong WK, Mao L, Wei Q (2002) A novel polymorphism in human cytosine DNA-methyltransferase-3B promoter is associated with an increased risk of lung cancer. *Cancer Res* 62: 4992-4995.
- Singal R, Das PM, Manoharan M, Reis IM, Schlesselman JJ (2005) Polymorphisms in the DNA methyltransferase 3b gene and prostate cancer risk. *Oncol Rep* 14:569-573. doi: 10.3892/or.14.2.569
- Stephens M, Scheet P (2005) Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing-data imputation. *Am J Hum Genet* 76: 449-462. doi: 10.1086/428594
- Stephens M, Smith NJ, Donnelly P (2001) A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 68: 978-989. doi: 10.1086/319501
- Sweatt JD (2010) Neuroscience: Epigenetics and Cognitive Aging. *Science* 328:701-702. doi: 10.1126/science.1189968
- Weschler D (2004) WAIS-III: Escala de inteligência Wechsler para adultos. WMS-III: Escala de memória Wechsler - manual técnico (trans: Silva MCdVM). Casa do Psicólogo, São Paulo.
- Weschler D (2004) WAIS-III: Escala de inteligência Wechsler para adultos. WMS-III: Escala de memória Wechsler - manual técnico (trans: Silva MCdVM). Casa do Psicólogo, São Paulo.

- Winkelmann J, Lin L, Schormair B, Kornum BR, Faraco J, Plazzi G, Melberg A, Cornelio F, Urban AE, Pizza F, Poli F, Grubert F, Wieland T, Graf E, Hallmayer J, Strom TM, Mignot E (2012) Mutations in DNMT1 cause autosomal dominant cerebellar ataxia, deafness and narcolepsy. *Hum Mol Genet* 21:2205-2210. doi: 10.1093/hmg/dds035
- Yu NK, Baek SH, Kaang BK et al (2011) DNA methylation-mediated control of learning and memory. *Mol Brain* 4:5. doi: 10.1186/1756-6606-4-5
- Zhang C, Fang Y, Xie B, Cheng W, Du Y, Wang D, Yu S. (2009) DNA methyltransferase 3B gene increases risk of early onset schizophrenia. *Neurosci Lett* 462: 308-311. doi: 10.1016/j.neulet.2009.06.085

Table 1 - Demographic characteristics of the study group.

Characteristic	
Total of subjects	241
Age (years)	63.27 ± 7.87
Sex (% of men)	54 (22.4)
Schooling (years)	10.37 ± 4.62
Hormonal replacement therapy, women only (%)	61 (32.6)
Age stopped studying (years)	26.24 ± 13.75
Years without studying	37.12 ± 16.24
Memory scores	
Short-term Verbal Memory	0.092 ± 1.039
Long-term Verbal Memory	0.033 ± 0.633
Short-term Visual Memory	0.010 ± 1.308
Long-term Visual Memory	-0.151 ± 1.264
Learning ability	-0.010 ± 1.263

The values shown are mean ± standard deviation or numbers and percentages in parentheses

Table 2 - Genotype, allele and haplotype frequencies of *DNMT1* and *DNMT3B* gene polymorphisms.

DNMT3B							
rs2424913		rs998382		rs2424932		Haplotype (rs2424913-rs998382-rs2424932)	
CC	32.6	GG	38.4	GG	38.8	TGG	38.2
CT	49.6	GA	44.2	GA	46.7	CAA	34.6
TT	17.8	AA	17.4	AA	14.5	CAG	22.3
T allele	42.5	A allele	39.6	A allele	38.0	TAA	2.7
						TAG	1.4
						Others	0.8
DNMT1							
rs759920		rs2162560		Haplotype (rs759920-rs2162560)			
AA	24.9	GG	34.9			GA	42.4
AG	51.4	AG	50.2			AG	48.3
GG	23.7	AA	14.9			GG	9.1
G allele	49.6	A allele	40.1			AA	0.2

Table 3 - Genotype of *DNMT1* and *DNMT3B* gene polymorphisms according to memory scores.

		Memory Score				
Genotype		Short-term	Long term	Short-term	Long-term	Learning ability
	N	Verbal	Verbal	Visual	Visual	
<i>DNMT1</i>						
rs2162560						
AA	36	-0.06 ± 1.04	0.05 ± 0.52	-0.06 ± 1.32	-0.30 ± 1.25	-0.08 ± 1.17
AG	121	0.17 ± 1.05	0.04 ± 0.66	-0.05 ± 1.34	-0.13 ± 1.24	0.02 ± 1.27
GG	84	0.04 ± 1.02	0.01 ± 0.63	0.12 ± 1.26	-0.12 ± 1.29	-0.07 ± 1.22
<i>p</i>		0.329	0.909	0.779	0.802	0.577
<i>rs759920</i>						
AA	60	0.12 ± 0.95	0.00 ± 0.60	0.25 ± 1.15	0.02 ± 1.19	-0.17 ± 1.16
AG	124	0.11 ± 1.07	0.04 ± 0.67	-0.07 ± 1.34	-0.16 ± 1.27	0.05 ± 1.24
GG	57	0.01 ± 1.07	0.03 ± 0.58	-0.07 ± 1.37	-0.34 ± 1.30	-0.05 ± 1.31
<i>p</i>		0.945	0.828	0.333	0.491	0.443
<i>DNMT3B</i>						
rs2424913						
CC	78	0.20 ± 0.99	0.01 ± 0.63	-0.01 ± 1.36	-0.21 ± 1.30	-0.11 ± 1.26
CT	120	0.08 ± 1.06	0.07 ± 0.63	-0.04 ± 1.32	-0.17 ± 1.22	0.04 ± 1.23
TT	43	-0.08 ± 1.06	-0.02 ± 0.63	0.20 ± 1.17	-0.01 ± 1.31	-0.07 ± 1.22
<i>p</i>		0.432	0.534	0.466	0.483	0.341
rs998382						
GG	42	-0.01 ± 1.03	0.01 ± 0.65	0.18 ± 1.16	-0.03 ± 1.28	-0.09 ± 1.25
GA	107	0.11 ± 1.05	0.07 ± 0.62	-0.05 ± 1.32	-0.16 ± 1.25	0.13 ± 1.19
AA	92	0.11 ± 1.03	- 0.01 ± 0.63	0.00 ± 1.36	-0.20 ± 1.28	-0.18 ± 1.27
<i>p</i>		0.757	0.587	0.596	0.645	0.103
rs2424932						
GG	94	0.12 ± 1.05	-0.06 ± 0.59 ^a	0.18 ± 1.13	-0.05 ± 1.18	-0.01 ± 1.18 ^d
GA	114	0.13 ± 1.05	0.14 ± 0.67 ^b	-0.04± 1.42	-0.17 ± 1.35	0.11 ± 1.26 ^d
AA	33	-0.14 ± 0.96	-0.09 ± 0.53 ^{a,b}	-0.30 ± 1.31	-0.43 ± 1.16	-0.57 ± 1.21 ^c
<i>p</i>		0.352	0.036	0.164	0.309	0.010

The memory scores are shown as mean ± standard deviation. ^{a,b} AA x GA, p=0.056; AA x GG, p=0.750; GA x GG, p=0.025. ^{c,d} AA x GA, p=0.002; AA x GG, p=0.022; GA x GG, p=0.326.

4. Considerações finais

Escore de memória e alterações cognitivas associadas ao envelhecimento são influenciados por fatores ambientais e genéticos, ou seja, possuem uma etiologia multifatorial. O número de trabalhos investigando a associação de fatores extrínsecos e intrínsecos com performances de memória tem aumentando ao longo dos anos, e isso se deve, entre outros motivos, à maior expectativa de vida da população em geral e à preocupação com a qualidade da saúde no processo de envelhecimento.

O objetivo principal deste trabalho foi investigar a participação de genes envolvidos na metilação de DNA no processo de modulação da memória, com foco para o déficit de memória associado ao envelhecimento. Alguns estudos demonstram uma associação entre polimorfismos nos genes que codificam as enzimas DNA Metiltransferases (DNMTs) e a doença de Alzheimer (DA). No entanto, o número de estudos e os dados científicos ainda são escassos e voltados para fenótipos mais extremos como a DA.

Encontramos uma associação estatisticamente significativa ($p=0,010$) entre indivíduos homozigotos AA para o polimorfismo rs2424932 do gene *DNMT3B* e menores escores de memória no Teste de Rey (Rey Auditory-Verbal Learning Test - RAVLT), que consiste em um teste de aprendizado verbal que tem por objetivo medir a memória recente, ou seja, a capacidade de armazenar novas informações. Além disso, observamos que este mesmo polimorfismo está associado com a memória verbal tardia (AA, $-0,09 \pm 0,53$; GA, $+0,14 \pm 0,67$; GG, $-0,06 \pm 0,59$, $p=0,036$).

Independente dos polimorfismos analisados, nosso estudo evidenciou uma associação entre o gene *DNMT3B* e escores de memória. Associações positivas deste mesmo gene com a DA já foram descritas na literatura. Desse modo, podemos inferir um possível envolvimento do gene *DNMT3B* com a modulação da memória humana.

Este estudo é um dos primeiros a descrever uma relação positiva entre a variabilidade genética do *DNMT3B* e menores escores de memória. Mais estudos sobre o papel da metilação do DNA no desempenho da memória são ainda necessários, uma vez que poderiam ser utilizados no futuro como um alvo de prevenção e prognóstico de deficiência de memória associada à idade, melhorando a qualidade de vida e saúde no envelhecimento.

5. Anexos

Anexo 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O projeto de pesquisa intitulado “Nutrigenética e escores de memória: interação entre o consumo de zinco e selênio e a variabilidade nos genes *apoe*, *sep15* e *slc30a3*” será desenvolvido na Universidade FEEVALE e na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA).

Uma característica bastante comum do envelhecimento é o declínio gradual de memória que, em maior ou em menor grau, alguns indivíduos sofrem ao chegar à terceira idade. Uma vez que o empobrecimento de memória produz problemas menores do que doenças típicas da terceira idade, as pesquisas para estudar tais prejuízos aparecem em um número reduzido. Pouco se sabe sobre as causas de tais declínios em alguns indivíduos em relação a outros que não sofrem os mesmos prejuízos.

A alimentação é um dos fatores que podem estar relacionados com a capacidade de memória de um indivíduo. O consumo de alimentos ricos nos micronutrientes selênio e zinco parecem exercer um efeito neuroprotetor. O número de estudos sobre o assunto, no entanto, ainda é muito pequeno para que se possa ter certeza sobre a influência neurobiológica destes nutrientes na memória dos indivíduos.

O presente estudo tem o objetivo de investigar a relação entre o consumo de alimentos ricos nesses micronutrientes e a memória em indivíduos acima dos 50 anos. Para tentar estabelecer essa relação, estudaremos indivíduos submetidos a testes de memória, aplicados sob a orientação das psicólogas Ms. Luciana Alves Tisser da Universidade FEEVALE e Dra. Caroline Reppold da UFCSPA.

Todos que aceitarem participar deste estudo responderão também a um questionário sobre hábitos alimentares, e serão submetidos a uma coleta de 5 ml de sangue. Essa amostra será utilizada para a extração do DNA e para a realização de dosagens de selênio e zinco, dados que serão comparados com o padrão alimentar relatado no questionário. Após a realização dessas dosagens, o material será descartado.

O procedimento de coleta de sangue não oferece risco ao paciente, visto que somente agulhas e seringas descartáveis serão utilizadas. Esse procedimento pode apresentar apenas o desconforto da introdução da agulha para a retirada do sangue, além

da possibilidade do aparecimento de um pequeno hematoma no local da picada, o qual desaparece comumente em poucas horas.

Nenhuma pessoa, além dos pesquisadores e de seus colaboradores diretamente envolvidos no projeto, terá acesso ao material proveniente da amostra de sangue. Todo plasma resultante da coleta não utilizado no presente trabalho será desprezado e descartado.

Eu fui informado dos objetivos especificados acima e da justificativa desta pesquisa de forma clara e detalhada. Recebi informações específicas sobre cada procedimento no qual estarei envolvido, do desconforto ou riscos previstos tanto quanto dos benefícios esperados. Tenho consciência de que nenhum dado deste projeto de pesquisa será útil para a prevenção de minha diminuição de memória, no entanto, entendo que estes dados auxiliarão, no futuro, para a detecção de indivíduos que estejam sob um risco aumentado de desenvolver esta característica.

Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento. Além disto, sei que novas informações obtidas durante o estudo me serão fornecidas e que terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa a qualquer momento.

O investigador certificou-me de que as informações por mim fornecidas terão caráter confidencial.

Assinatura do participante:

Assinatura do investigador:

Pesquisadores Responsáveis:

Prof. Dra. Marilu Fiegenbaum(UFCSPA).....

Telefone para contato: (51) 3303-8773

Dra. Fabiana Michelsen de Andrade (FEEVALE)

Telefone para contato: (51) 3586-8800, r. 8938

Anexo 2

Parecer Consubstanciado de Projeto de Pesquisa

Título do Projeto: Análise da Interação entre fatores ambientais e genéticos e sua influência sobre escores de memória.

Pesquisador Responsável Alcyr Oliveira Junior **Parecer** 1217/10

Data da Versão
09/07/2010

Cadastro 666/10

Data do Parecer
21/10/2010

Grupo e Área Temática

III - Projeto fora das áreas temáticas especiais *

Objetivos do Projeto

Adequados

Sumário do Projeto

Adequado

Itens Metodológicos e Éticos	Situação
Título	Adequado
Autores	Adequados
Local de Origem na Instituição	Adequado
Projeto elaborado por patrocinador	Não
Aprovação no país de origem	Não necessita
Local de Realização	Própria instituição
Outras instituições envolvidas	Sim
Condições para realização	Adequadas

Comentários sobre os itens de Identificação
Centro Universitário FEEVALE.

Introdução	Adequada
-------------------	-----------------

Comentários sobre a Introdução

Objetivos	Adequados
------------------	------------------

Comentários sobre os Objetivos

Pacientes e Métodos	
Delineamento	Adequado
Tamanho de amostra	Total 188 Local 99
Cálculo do tamanho da amostra	Adequado
Participantes pertencentes a grupos especiais	Não
Seleção equitativa dos indivíduos participantes	Adequada
Crerios de inclusão e exclusão	Adequados
Relação risco- benefício	Adequada
Uso de placebo	Não utiliza
Período de suspensão de uso de drogas (wash out)	Não utiliza
Monitoramento da segurança e dados	Adequado
Avaliação dos dados	Adequada - quantitativa
Privacidade e confidencialidade	Adequada
Termo de Consentimento	Adequado
Adequação às Normas e Diretrizes	Sim

Comentários sobre os itens de Pacientes e Métodos

Cronograma	Comentário
Data de início prevista	07/2010

Anexo 3

Pró-Reitoria de Pesquisa, Tecnologia e Inovação

**AVALIAÇÃO DE PROJETOS DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP**

O Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Universitário Feevale analisou o projeto:

Título: Análise da interação entre fatores ambientais e genéticos na suscetibilidade à perda de memória e à doença de Alzheimer

Processo nº 2.02.01.06.342

Líder do Projeto: Fabiana Michelsen de Andrade

Classificação no Fluxograma da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP:
(X) Grupo III

Tipo da proposta: Pesquisa Institucional

Parecer geral do projeto protocolado: aprovado

Comentários gerais sobre o projeto:

Em conformidade com a Resolução nº 196 de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde, e com as normas internas do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Universitário Feevale, todos os documentos necessários à análise do projeto acima referido por este Comitê foram apresentados.

Este projeto preserva os aspectos éticos dos sujeitos da pesquisa, sendo, portanto, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Universitário Feevale.

Reiteramos que o Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição encontra-se à sua disposição para equacionar eventuais dúvidas e/ou esclarecimentos que se fizerem necessários.

Novo Hamburgo, 03 de outubro de 2006.

Profª Ms. Márcia Otero Sanches

Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Universitário Feevale

Anexo 4**FICHA DE INFORMAÇÕES DO PACIENTE / VOLUNTÁRIO****NOME:** _____**CONTATO:** _____**No. da amostra:** _____ **Paciente ou voluntário?** _____**Descendência:** _____**Sexo** _____ **Idade:** _____ **Se paciente, idade de diagnóstico** _____**Grau de escolaridade:**

estudou até qual série? _____ com que idade se formou? _____

fez algum curso depois de formado? Quando _____ quanto tempo? _____

Consumo de álcool entre 20 e 30 anos:

Cerveja: quantidade por semana _____

Vinho: quantidade por semana _____

Outros: quantidade por semana _____ (tipo _____)

Consumo de álcool após os 40 anos:

Cerveja: quantidade por semana _____

Vinho: quantidade por semana _____

Outros: quantidade por semana _____ (tipo _____)

Tabagismo:**Entre 20 e 30 anos:** no. de pacotes por dia _____ no. de anos _____**Após os 40 anos:** no. de pacotes por dia _____ no. de anos _____**Histórico clínico****Uso de medicamento de uso contínuo?**

Entre 20 e 30 anos: _____

Após os 40 anos: _____

Mulheres:

Idade ao climatério_____

Uso de terapia de reposição hormonal?

atual_____

passada_____ tempo de duração_____

Pressão arterial:

Hipertensão atual? _____

Hipertensão no passado?_____

Outras informações:

Anexo 5

QUESTIONÁRIO SOBRE PADRÕES DE ATIVIDADES

(Lindstrom e cols., 2005)

NOME: _____

No. da amostra: _____

Categorias de atividades	Tipos de atividades	Horas por semana entre 20 e 30 anos	Horas por semana após os 40 anos
“Passivas”	Ver televisão		
	Ouvir música		
	Falar ao telefone		
	Ir à igreja		
	Reunir-se com amigos		
“Intelectuais”	Ler		
	Montar quebra-cabeças		
	Fazer palavras-cruzadas		
	Tocar um instrumento musical		
	Pintar, desenhar, outro tipo de trabalho manual		
	Fazer artesanato		
	Trabalhar com madeira		
	Fazer pequenos reparos em casa		
	Escrever cartas		
	Jogar cartas		
	Jogar jogos de tabuleiro (dama, xadrez, outros)		
	Crochet, tricô, ou outro trabalho com agulhas		
“Físicas”	Jogar futebol, basquete ou vôlei		
	Treinar academia ou dançar		
	Fazer esportes com raquete		
	Andar de bicicleta		
	Jogar golfe ou boliche		
	Trabalhar com jardinagem		
	Correr ou nadar		
	Caminhar		

Anexo 6

Informações adicionais de Materiais e Métodos

✓ Critérios para seleção dos participantes

Critérios de inclusão: ter no mínimo 50 anos e estar capacitado para a leitura do TCLE e de algumas partes dos testes psicológicos. Além disso, permitir a coleta de sangue para a obtenção do material genético.

Critérios de exclusão: presença de doença neurológica diagnosticada ou acidente vascular cerebral de qualquer tipo ou gravidade. Os participantes que apresentaram qualquer grau de deficiência cognitiva, estresse, ansiedade ou depressão, detectados na avaliação psicológica, foram excluídos do estudo por estes serem fatores que podem confundir a correta avaliação dos escores de memória.

✓ Determinação de escores de memória

Todas as avaliações foram realizadas por alunos dos cursos de Psicologia da UFCSPA e FEEVALE, previamente treinados pelas psicólogas Profa. Ms Luciana Tisser (FEEVALE) e Profa. Dra. Caroline Tozzi Reppold (UFCSPA).

Dois métodos foram utilizados para a obtenção de escores de memória: a Escala de Inteligência Wechsler para Adultos- III (WAIS-III) e o Teste Rey.

O método WAIS-III é considerado um instrumento padrão-ouro de

avaliação intelectual de adultos na faixa etária entre 16 e 89 anos. Este teste é composto por 14 subtestes organizados em duas escalas: Verbal e de Execução. A WAIS-III fornece dados normativos atuais sobre desempenho cognitivo (em uma medida global) e sobre funções psicológicas isoladas, como, por exemplo, memória de trabalho, memórias de curto e longo prazo, e memórias declarativas. Esta escala foi adaptada, validada e normatizada para um contexto brasileiro (Wechsler, 1997; Nascimento e Figueredo, 2002; Banhato, 2007).

O segundo método utilizado, denominado de Teste de Rey (Rey Auditory-Verbal Learning Test - RAVLT), consiste em um teste de aprendizado verbal que tem por objetivo medir a memória recente, a aprendizagem verbal e a capacidade de armazenar novas informações. É um teste rápido e simples de aplicar e seu uso tem sido amplamente reconhecido na literatura neuropsicológica. Ele foi originalmente desenvolvido por Rey e, posteriormente, traduzido e adaptado por autores de vários países. É um teste sensível às deficiências de memória encontradas em muitos grupos, sendo útil para o diagnóstico de distúrbios de memória (Malloy-Diniz e cols., 2007).

De acordo com os métodos acima citados, cinco parâmetros de memória foram avaliados (quatro pela WAIS-III e um pelo Teste de Rey) fornecendo escores que podem variar de - 4 a 4 e para os quais valores menores que -1 demonstram déficit no tipo específico de memória testada:

“Lógica I”: teste para memória verbal imediata, que tem por objetivo medir a capacidade de lembrar fatos recentes;

“Lógica II”: teste para memória verbal tardia, que tem por objetivo medir a capacidade de lembrar fatos antigos;

“VRI”: teste para memória visual imediata, que tem por objetivo medir a capacidade de recordar imagens recentes;

“VRII”: teste para memória visual tardia, que tem por objetivo medir a capacidade de recordar imagens tardias;

“Teste de Rey”: teste para aprendizado verbal que tem por objetivo medir a capacidade de armazenar novas informações.

✓ **Testes para critérios de exclusão**

Com o objetivo de avaliar possíveis interferências do transtorno depressivo e de ansiedade, além de estresse sobre as funções executivas, foram administrados testes para detectar a presença destes transtornos e os níveis existentes. Além disto, foi determinado o QI estimado, de acordo com a Escala de Inteligência Wechsler para Adultos- III (WAIS-III), para excluir possíveis voluntários com graus leves de déficit intelectual. A presença de baixo QI estimado, estresse, ansiedade ou depressão foi utilizada como critério de exclusão da amostra, pois são fatores importantes de interferência sobre os escores de memória.

O Inventário de Depressão de Beck (BDI) e o Inventário de Ansiedade de Beck (BAI) são questionários auto-aplicados e validados no Brasil. O Inventário de Depressão de Beck é provavelmente a medida de auto-avaliação de depressão mais amplamente utilizada, tanto em pesquisa como na clínica. A escala original consiste em 21 itens, incluindo sintomas e atitudes, cuja intensidade varia de 0 a 3. Os itens referem-se à tristeza, pessimismo, sensação de fracasso, falta de satisfação, sensação de culpa, sensação de

punição, autodepreciação, auto-acusações, ideias suicidas, crises de choro, irritabilidade, retração social, indecisão, distorção da imagem corporal, inibição para o trabalho, distúrbio do sono, fadiga, perda de apetite, perda de peso, preocupação somática e diminuição de libido. Já o Inventário de Ansiedade de Beck consiste em 21 itens, incluindo sintomas presentes em quadros ansiosos (Cunha, 2001).

O inventário de Lipp (2000) tem como objetivo identificar de maneira objetiva se o indivíduo apresenta a sintomatologia de estresse e se os sintomas do estresse são predominantemente físicos ou psicológicos. Este inventário ainda estabelece a fase de estresse em que o sujeito se encontra: alerta, resistência, quase exaustão e exaustão. A fase de alerta identifica o momento em que o organismo está se preparando para enfrentar o problema ou fugir dele, preservando sua existência. Na segunda fase, resistência, o organismo está procurando se adaptar para sobreviver e equilibrar-se, e aparecem sensações de desgaste e cansaço. A terceira fase é a de quase-exaustão em que o sujeito não consegue lidar com o evento estressor que se mantém contínuo e começa a adoecer. Quando a situação se agrava ainda mais, surge a quarta e última fase, exaustão, em que toda a energia adaptativa do indivíduo foi exaurida. Neste momento é que surgem as doenças mais graves (Lipp, 2000).

Referências adicionais

Banhato EFC, Nascimento E. Função executiva em idosos: um estudo utilizando subtestes da Escala WAIS-III. *Psico-USF*. 2007;12(1):65-73.

Cunha JA. Manual da versão em português das Escalas de Beck. 1ª ed. São Paulo: Casa do Psicólogo; 2001.

Lipp MEN. Manual do inventário de sintomas de stress para adultos de Lipp. São Paulo: Casa do psicólogo; 2000.

Malloy-Diniz LF, Lasmar VAP, Gazinelli LSR, Fuentes D, Salgado JV. The Rey Auditory-Verbal Learning Test: applicability for the Brazilian elderly population. *Rev Bras Psiquiatr*. 2007;29:324-9.

Nascimento E, Figueredo VLM. WISC-III e WAIS-III: Alterações nas versões originais americanas decorrentes das adaptações para uso no Brasil. *Psicologia: Reflexão e Crítica*. 2002;15(3):603-12.