

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

LÍGIA RAMOS DOS SANTOS

**BUSCA DE UM PERFIL DE BIOMARCADORES
PARA A DOENÇA DE ALZHEIMER: ENFOQUE EM
GENES DA VIA INFLAMATÓRIA**

VITÓRIA

2017

LÍGIA RAMOS DOS SANTOS

**BUSCA DE UM PERFIL DE BIOMARCADORES PARA
A DOENÇA DE ALZHEIMER: ENFOQUE EM GENES
DA VIA INFLAMATÓRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Profa. Dra. Flavia de Paula

VITÓRIA

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do
Espírito Santo, ES, Brasil)

S237b Santos, Lígia Ramos dos, 1987 -
Busca de um perfil de biomarcadores para a Doença de Alzheimer:
enfoque em genes da via inflamatória / Lígia Ramos dos Santos – 2017.
127 f. : il.

Orientador(a): Flavia de Paula.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do
Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Doença de Alzheimer. 2. Biomarcadores. 3. Polimorfismo Genético.
4. Epistasia Genética. I. Paula, Flavia de. II. Universidade Federal do Espírito
Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

“Busca de um Perfil de Biomarcadores para a Doença de Alzheimer: Enfoque em Genes da Via Inflamatória”

Lígia Ramos dos Santos

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovado por:

Prof^a. Dr^a. Flavia de Paula (UFES)

Orientadora

Prof^a. Dr^a. Flávia Imbroisi Valle Errera (UFES)

Membro Interno

Prof. Dr. Renato Lírio Morelato (EMESCAM)

Membro Externo

Prof^a. Dr^a. Maria Rita Passos Bueno (USP)

Membro Externo

Vitória-ES, 20 de Fevereiro de 2017.

À todos os idosos que conheci durante a pesquisa no Hospital Santa Casa de Misericórdia, dedico este trabalho à vocês, meus verdadeiros guerreiros.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família, meu porto seguro e alegria diária. Muito obrigada por sempre me apoiarem em todas as minhas escolhas e por entenderem minha paixão pela pesquisa mesmo nos momentos que estive ausente. Agradeço também à todos meus amigos de faculdade e de vida, pelo grande carinho, pela paciência comigo e por me fazerem ver o lado bom de toda adversidade!

Agradeço especialmente à minha orientadora Profa. Dra. Flavia de Paula pela tranquilidade nas orientações. Desde a iniciação científica, são 6 anos de muito aprendizado que os valorizo muito, de confiança no laboratório e na pesquisa. Muito obrigada por me incentivar a crescer como pesquisadora e por embarcar comigo na minha constante busca por respostas.

Agradeço à todos os pesquisadores do Núcleo de Genética Humana e Molecular da UFES que me ajudaram na pesquisa. À Maíra, Gillian, Daniela, Dalila, Aline, Nathalia e Jucimara, pela ajuda, pelos conselhos e por me acompanharem nessa jornada.

Agradeço especialmente à Profa. Ma. Lúcia Helena Sagrillo Pimassoni por toda ajuda na análise estatística do trabalho. Pela tranquilidade em testar minhas hipóteses mesmo quando elas dependiam de várias análises. Também agradeço a ajuda nas análises estatísticas feita pela equipe do Laboratório de Estatística LESTAT da UFES.

Agradeço à Profa. Dra. Maria Rita Passos Bueno e à Profa. Dra. Patrícia Machado Bueno Fernandes por terem me consentido de bom grado realizar parte dos testes em seus laboratórios. Muito obrigada também aos seus orientandos que me receberam e auxiliaram com prazer !

Agradeço ao Prof. Dr. Renato e as enfermeiras Amábilis, Flavia e Érica do Hospital Santa Casa de Misericórdia de Vitória (HSCMV) pela paciência, carinho e aprendizado que obtive na prática no hospital e pelos conselhos.

Agradeço imensamente aos idosos do Hospital Santa Casa de Misericórdia de Vitória e do Centro de Referência de Atendimento ao Idoso (CRAI). Muito obrigada por concordarem em participar do trabalho, por compartilharem suas histórias comigo e pelo aprendizado de vida que adquiri com vocês. Sem vocês esse trabalho não ganharia vida.

Agradeço pelo apoio financeiro da FACITEC, MCTI/CNPQ/MEC/CAPES para a realização desse trabalho.

“Biology isn’t a subject in which you can have great thoughts in the bath. Leo Szilard, the nuclear physicist, used to say to me that when he left physics and went into biology he could never have a comfortable bath, because no sooner did he get into it to think, than he had to get out to look up another fact.” –Sydney Brenner

RESUMO

SANTOS, L.R. **Busca de um perfil de Biomarcadores para a Doença de Alzheimer: enfoque em genes da via inflamatória.** 2017. 130 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2017.

Doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa progressiva e é o tipo mais comum de demência que afeta idosos. Como características patológicas, apresenta os emaranhados de neurofibrilas e placas amilóides no cérebro. Em 98% dos casos, DA é esporádica (DAE) pelo qual o alelo $\epsilon 4$ do gene *APOE* atua como o maior fator de risco genético. Como os eventos fisiopatológicos podem surgir anos antes do surgimento dos primeiros sintomas de DA, as pesquisas estudam utilizar biomarcadores na fase de DA pré-clínica dos pacientes para identificar traços da doença antes do seu estabelecimento por completo. Assim, o trabalho teve como objetivo principal investigar a criação de um possível perfil de biomarcadores genéticos para a Doença de Alzheimer Esporádica com os polimorfismos nos genes *ABCA7* (rs3764650), *MS4A6A* (rs610932), *CD33* (rs3865444), *CR1* (rs6656401), *BIN1* (rs744373), *IL-6* (rs1800795), *CLU* (rs1136000) e *APOE* (rs429358 e rs7412) em uma amostra de pacientes e controles na população da Grande Vitória-ES. O estudo realizado foi de associação com 241 indivíduos não consanguíneos, incluindo 159 indivíduos não demenciados pareados em relação à idade e sexo e 82 pacientes com diagnóstico provável de DA. Para genotipagem foram realizadas técnicas de genotipagem por *Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism* e *Real-Time Polymerase Chain Reaction*, além de sequenciamento de genótipos padrão. Como análise estatística, foram realizados teste Qui-quadrado, Odds ratio, Intervalo de confiança de 95%, *Mann-Whitney* e Regressão logística no programa SPSS. Foi considerado o valor de $p \leq 0,05$ significativo nas análises. Foi analisado a interação de epistasia estatística em pares de polimorfismos de uma mesma via patológica na DA através de regressão logística. Foi também calculado o Equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada grupo estudado. Foi encontrado associação apenas para o gene *CD33*. O polimorfismo nesse gene mostrou associação para DAE com o genótipo GT como fator de proteção (95% IC: 0,299-0,942; $p=0.042$). Este resultado apoia o papel de proteção

do gene *CD33* na via inflamatória para a DAE, uma vez que a proteína de *CD33* pode atuar na limpeza de peptídeos β amilóide formados na DA. A análise de regressão logística não encontrou associação para os polimorfismos quando associados com outras variáveis como idade, sexo, escolaridade, etnia e status do *APOE*. Na análise de epistasia, foi encontrada associação de risco apenas entre os polimorfismos no gene *APOE* com *BIN1* e *APOE* com *CLU* para DAE. Esses resultados apoiam o papel dos genes *APOE*, *BIN1* e *CLU* na via do metabolismo, tráfego e endocitose de lipídios da DA. Além disso, este resultado apoia a hipótese de que os genes *APOE* e *CLU* podem regular juntos a eliminação dos peptídeos $A\beta$ sintetizados no cérebro. E ainda, o resultado da interação dos genes *BIN1* e *APOE* apoia a hipótese de que a proteína *BIN1* pode regular a eliminação dos peptídeos $A\beta$ através da internalização do complexo de $A\beta$ com *APOE*. Os resultados do estudo deram abertura para a criação de um painel de biomarcadores genéticos para DAE na população da Grande Vitória-ES.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer Esporádica. Biomarcadores. Estudo de Associação.

ABSTRACT

SANTOS, L.R. **Search of Biomarker's profile for Alzheimer disease: focus on genes of inflammatory pathway.** 2017. 130 f. Dissertation (Master in Biotechnology) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2017.

Alzheimer disease (AD) is a progressive neurodegenerative disease and the most common type of dementia that affects elders. As pathological features, it presents neurofibrillary tangles and amyloid plaques in the brain. In 98% of the cases, AD is sporadic or late-onset AD (LOAD) and the $\epsilon 4$ allele of *APOE* gene acts as the most risk factor. As the pathological events may appear years before the first symptoms of AD, the research seek to use biomarkers in AD pre-clinic phase to identify traces of the disease before it establishment. Therefore, the work aimed investigate the creation of a possible genetic biomarkers profile for Late-onset Alzheimer disease with the polymorphisms at the genes *ABCA7* (rs3764650), *MS4A6A* (rs610932), *CD33* (rs3865444), *CR1* (rs6656401), *BIN1* (rs744373), *IL-6* (rs1800795), *CLU* (rs1136000) and *APOE* (rs429358 and rs7412) in a sample of patients and controls in Grande Vitória-ES population. The study performed was an association study with 241 individuals not consanguineous, including 159 individuals without Dementia matched by sex and age and 82 patients with diagnosis of probable AD. It was performed as genotyping Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism, Real-Time Polymerase Chain Reaction and sequencing of genotype standards. As statistic analysis, it was performed Chi-square test, Odds ratio, Confidential interval of 95%, Mann-Whitney and Logistic regression at SPSS software. It was consider p significance with value ≤ 0.05 . It was analyzed statistic epistasis in pares of polymorphisms from the same pathway to AD by Logistic regression. It was also calculated the Hardy-Weinberg Equilibrium for each group. It was found association only for rs3865444 *CD33*. This polymorphism had showed association to LOAD with GT genotype as protection factor (95% CI: 0.299-0.942; $p=0.042$). This result supports a role of protection of *CD33* gene at inflammatory pathway to LOAD, since the CD33 protein may contribute with $A\beta 42$ clearance in AD. The logistic regression analysis did not found association for the others polymorphisms when associated with others variables as age, gender, school level,

ethnic background and *APOE* status. In epistasis analysis, it was found risk association among polymorphisms at *APOE* with *BIN1* and *APOE* with *CLU* for LOAD. These results supports a role of *APOE*, *BIN1* and *CLU* genes at metabolism, trafficking and endocytosis of lipid pathway in AD. Also, this data support the hypothesis that *APOE* and *CLU* genes may regulate together the elimination of A β formed in brain. Additionally, the result of interaction of *BIN1* and *APOE* support the notion that *BIN1* protein could participate in A β clearance by the internalization of A β -apoe complex. The results of the study gave an opening for a creation of a genetic biomarkers profile for LOAD in Grande Vitória-ES population.

Keywords: Sporadic Alzheimer disease. Biomarkers. Association study.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fotos de Aloysius, seus desenhos e de Auguste.....	22
Figura 2 - Prevalência da Demência nos países com maior número de afetados em 2010.....	23
Figura 3 - Projeção mundial de afetados por Demência.....	23
Figura 4 - Imagens de microscópio de placas senis.....	25
Figura 5 - Imagens de emaranhados de neurofibrilas.....	26
Figura 6 - Imagem da formação de emaranhados de neurofibrilas.....	27
Figura 7 - Localização dos genes <i>APP</i> , <i>PSEN1</i> e <i>PSN2</i> nos cromossomos.....	30
Figura 8 - Via não-amiloidogênica da proteína <i>APP</i>	31
Figura 9 - Via amiloidogênica.	32
Figura 10 - Variante de risco para Doença de Alzheimer em novos genes reportados por estudos GWAS.....	34
Figura 11 - Mecanismos de eliminação de peptídeos A β formados no cérebro.....	43
Figura 12 - Mecanismos de ativação de células de micróglia em processos inflamatórios.....	45
Figura 13 - Géis com produto de PCR dos SNPs em estudo.	70
Figura 14 -Géis de produtos da Digestão em SNPs em estudo. Géis.....	71
Figura 15 - Gráfico de fluorescência em ΔR_n x ciclos de amostras para o SNP rs3764650 no gene <i>ABCA7</i>	72
Figura 16 - Gráfico de fluorescência em ΔR_n x ciclos de amostras para o SNP rs610932 no gene <i>MS4A6A</i>	72
Figura 17 - Gráfico de fluorescência em ΔR_n x ciclos de amostras para o SNP rs6656401 no gene <i>CR1</i>	73
Figura 18 - Eletroferogramas obtidos pelo o sequenciamento de Sanger dos SNPs nos genes <i>CR1</i> , <i>ABCA7</i> , <i>CD33</i> e <i>MS4A6A</i>	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estudos da Prevalência de Demência no Brasil.....	24
Tabela 2 - Genes associados com DA em estudos GWAS.....	34
Tabela 3 - Sequência dos <i>primers</i> utilizados nas reações de PCR.....	59
Tabela 4 - Padronização dos reagentes para a reação da PCR.	60
Tabela 5 - Padronização da reação de PCR para os genes em estudo.	60
Tabela 6 - Padronização da Eletroforese em Gel para os genes em estudo.....	60
Tabela 7 - Padronização da Digestão do produto de PCR para os genes <i>IL-6</i> , <i>BIN1</i> e <i>CD33</i>	61
Tabela 8 - Tamanho de fragmento gerado por digestão para os genes <i>IL-6</i> , <i>BIN1</i> e <i>CD33</i>	62
Tabela 9 - Identificação dos ensaios <i>TaqMan</i> ® usados para os genes <i>ABCA7</i> , <i>MS4A6A</i> e <i>CR1</i>	63
Tabela 10 - Padronização dos reagentes para a reação da qPCR.	63
Tabela 11 - Reação de qPCR padronizada para os genes <i>ABCA7</i> , <i>MS4A6A</i> e <i>CR1</i>	64
Tabela 12 - Identificação dos genótipos dos SNPs para os genes <i>ABCA7</i> , <i>MS4A6A</i> e <i>CR1</i>	64
Tabela 13 - Sequência dos <i>primers</i> utilizados nas reações de PCR para sequenciamento.....	65
Tabela 14 - Padronização dos reagentes para a reação da PCR para sequenciamento.....	65
Tabela 15 - Padronização da reação de PCR para o sequenciamento.....	66
Tabela 16: Padronização da Eletroforese em Gel para sequenciamento.....	66

LISTA DE SIGLAS

AA	<i>Alzheimer's Association</i>
ABCA7	<i>ATP-binding cassette transporter A7</i>
ABCA1	<i>ATP-binding cassette transporter A1</i>
A β	Peptídeos β amilóide
A β ₄₂	Peptídeo β amilóide de aminoácido 42
A β ₄₀	Peptídeo β amilóide de 40 aminoácidos
ADAM	<i>A Disintegrin And Metalloproteinase</i>
ADAM9	<i>A Disintegrin And Metalloproteinase 9</i>
ADAM10	<i>A Disintegrin And Metalloproteinase 10</i>
ADAM17	<i>A Disintegrin And Metalloproteinase 17</i>
ADRDA	<i>Alzheimer's Disease and Related Disorders Association</i>
AICD	Domínio amilóide intracelular
APOE	<i>Apolipoproteína E</i>
APOJ	<i>Apolipoprotein J</i>
APP	<i>Proteína Precursora Amilóide</i>
BACE	<i>β site APP cleaving enzyme</i>
BACE1	<i>β site APP cleaving enzyme 1</i>
BAR	<i>Bin/Amphiphysin/Rvs</i>
BIN1	<i>Bridging integrator 1</i>
BOLD-fMRI	<i>Blood-Oxygenation Level Dependent - functional MRI</i>
CD33	<i>Cluster of differentiation 33</i>
CDR	<i>Clinical Dementia Rating Scale</i>
CLU	<i>Clusterin</i>
CR1	<i>Complement receptor 1</i>
CT ₈₃	Fragmento residual C-terminal de 83 aminoácidos
CT ₉₉	Fragmento residual C-terminal de 99 aminoácidos
CT ₅₇₋₅₉	Fragmento C-terminal de 57 à 59
DA	Doença de Alzheimer
DAE	Doença de Alzheimer Esporádica
DAF	Doença de Alzheimer Familiar
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EH-W	Equilíbrio de Hardy-Weinberg

FDG-PET	<i>Fluorodeoxyglucose-PET</i>
GSK3	Glicogênio sintase cinase 3
GWAS	<i>Genome-wide association study</i>
<i>IL-6</i>	<i>Interleukin 6</i>
IC	Intervalo de confiança
IRM	Imagem por Ressonância Magnética
LPR1	<i>Low-density lipoprotein receptors-related protein 1</i>
LPR2	<i>Low-density lipoprotein receptors-related protein 2</i>
<i>MAPT</i>	<i>Microtubule-associated protein tau</i>
<i>MS4A6A</i>	<i>Membrane-spanning 4-domains subfamily A6A</i>
MMSE	<i>Mini-Mental State Examination</i>
<i>MS4A</i>	<i>Membrane-spanning 4-domains subfamily A</i>
MRI	<i>Magnetic Resonance Imaging</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NINCDS	<i>National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke</i>
NIA	<i>National Institute on Aging</i>
OR	<i>Odds ratio</i>
OEGE	<i>Online Encyclopedia for Genetic Epidemiology studies</i>
<i>PSNE1</i>	<i>Presenilina 1</i>
<i>PSEN2</i>	<i>Presenilina 2</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PET	<i>Positron Emission Tomography</i>
PIB-PET	<i>Pittsburgh compound B- PET</i>
qPCR	<i>Real-Time Polymerase Chain Reaction</i>
NFQ	<i>Non-fluorescence quencher</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
sAPP α	Peptídio solúvel APP α
sAPP β	Peptídio solúvel APP β aminoácidos
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SREBP2	<i>Sterol regulatory element- binding protein 2</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1. Histórico da Doença de Alzheimer.....	20
2.2. Epidemiologia.....	22
2.3. Histopatologia.....	24
2.4. Diagnóstico da Doença de Alzheimer.....	27
2.5. Genética da Doença de Alzheimer.....	29
2.5.1. Doença de Alzheimer Familiar.....	29
2.5.2. Doença de Alzheimer Esporádica.....	32
2.5.3. Novos genes associados à Doença de Alzheimer Esporádica.....	33
2.5.3.1. Gene ABCA7.....	35
2.5.3.2. Gene CD33.....	36
2.5.3.3. Gene MS4A6A.....	37
2.5.3.4. Gene CR1.....	37
2.5.3.5. Gene BIN1.....	38
2.5.3.6. Gene CLU.....	39
2.5.3.7. Gene IL-6.....	40
2.6. Possíveis novas vias metabólicas na Doença de Alzheimer.....	40
2.6.1. Via do metabolismo, tráfego e endocitose de lipídios	41
2.6.2. Via inflamatória.....	44
2.7. Estudo de Epistasia na Doença de Alzheimer.....	48
2.8. Biomarcadores na Doença de Alzheimer.....	49
3. OBJETIVOS.....	54
3.1. Objetivo geral.....	54
3.2. Objetivos Específicos.....	54
4. METODOLOGIA.....	56
4.1. Considerações Éticas.....	56
4.2. Amostra.....	56
4.3. Coleta de Sangue.....	57
4.4. Dados demográficos.....	58
4.5. Genotipagem.....	58
4.5.1. Genotipagem dos genes IL-6, BIN1 e CD33	59

4.5.2. Genotipagem dos genes ABCA7, MS4A6A e CR1	62
4.6. Sequenciamento	64
4.7. Análise estatística	66
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
5.1. Resultado da Genotipagem	69
5.1.1. PCR	69
5.1.2. RFLP	70
5.1.3. qPCR	71
5.2. Resultado de Sequenciamento	73
5.3. Resultado de Análise Estatística	74
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	115
7. REFERÊNCIAS	117

1. INTRODUÇÃO

A Demência é uma desordem neurocognitiva que compromete funções de memória e cognição de idosos. Atualmente, afeta 47 milhões de pessoas no mundo (PRINCE et al., 2016). Um dos tipos mais comuns de Demência é a Doença de Alzheimer (DA), uma doença neurodegenerativa progressiva do cérebro (SERPENTE et al., 2014).

A Doença de Alzheimer é caracterizada por grandes atrofia cerebrais e formação de emaranhados de neurofibrilas e de placas amilóides, os dois grandes *hallmarkers* de DA (GEORGE, 2000). Eles resultam em quebra geral de transporte cerebral e morte neuronal (PASTERNAK, 2007). Geneticamente, DA é classificada em DA familiar (DAF) e DA esporádica (DAE). A DAE representa 98% dos casos (YU; TAN; HARDY, 2014) e apresenta característica multifatorial, com fatores ambientais e genéticos. Até o momento, o alelo e4 do gene *Apolipoproteína E (APOE)* é considerado o maior fator de risco para DAE em populações distintas (LAMBERT; AMOUYEL, 2011).

Atualmente, o tratamento utilizado na DA controla os sintomas de comportamento e deficiência cognitiva mas são limitados e não evitam a progressão neurodegenerativa da doença (DELRIEU et al., 2011). Além disso, é esperado cada vez mais um aumento no número de pacientes afetados, o que a torna uma grande preocupação de saúde pública (EL GAAMOUCHE et al., 2016). São necessários estudos que trabalhem novas terapias para prever ou delongar os iniciais estágios da doença. Uma estratégia é o estudo de biomarcadores.

Sabe-se que os eventos da patologia de DA podem surgir 10 anos antes do surgimento dos primeiros sintomas de DA (JACK et al., 2010, apud CAIXETA, 2012;). Assim, as pesquisas estudam utilizar biomarcadores na fase de DA pré-clínica dos pacientes antes do seu estabelecimento por completo. No entanto, carece de biomarcadores mais acessíveis e menos invasivos (LISTA et al., 2015; ZAFARI et al., 2015). Nesse aspecto, o estudo de Ma e Lam (2011) sugere a criação de um painel de biomarcadores com variantes genéticas para a DA.

Para a criação de um painel de biomarcadores, é necessário selecionar variantes que apresentem associação para a DA. Assim, polimorfismos reportados por *Genome-wide association study* (GWAS) que apresentem associação para DAE são referências de variantes à serem estudadas no painel. Exemplos desses polimorfismos são o rs3764650 *ABCA7*, rs744373 *BIN1*, rs6656401 *CR1*, rs610932 *MS4A6A*, rs3865444 *CD33* e rs1136000 *CLU* (HAROLD et al., 2009; HOLLINGWORTH et al., 2011a; KARCH; GOATE, 2014; LAMBERT et al., 2009; NAJ et al., 2011). Além de polimorfismos reportados por GWAS, genes que são constantemente estudados em DAE são válidos, como o gene *IL-6* e seu polimorfismo rs1800795 e o alelo ϵ 4 do gene *APOE*.

O painel de biomarcadores genéticos deve ser testado em populações específicas. Isto porque variantes de risco podem variar em população diferentes (ALLEN et al., 2012; TAN et al., 2013). E ainda, como esses polimorfismos correspondem com pequeno efeito para a doença e a herança de mais de uma variável em um gene pode levar ao desenvolvimento de DA (COMBARROS et al., 2009a), é fundamental estudar interações de epistasias entre as variantes também. O estudo da relação entre polimorfismos de uma mesma via para a DA, como a via do metabolismo, tráfego e endocitose de lipídios e via inflamatória, podem ajudar a elucidar sobre o desenvolvimento de DA.

A criação de um painel de biomarcadores de variantes genéticas poderia ser utilizado para auxiliar no diagnóstico precoce da doença, principalmente em pacientes na fase de DA pré-clínica. Também poderia contribuir para melhorar a precisão no diagnóstico para a Doença de Alzheimer com análise de forma multimodal em conjunto com outros biomarcadores.

Assim, o presente trabalho estudou os SNPs rs3764650 *ABCA7*, rs744373 *BIN1*, rs6656401 *CR1*, rs610932 *MS4A6A*, rs3865444 *CD33* e rs1800795 *IL-6*. Dados alélicos e genotípicos dos SNPs no gene *CLU* (rs1136000) e *APOE* (rs429358 e rs7412) foram aferidos de trabalhos já realizados por outros pesquisadores (ALMADA et al., 2012; BELCAVELLO et al., 2015) na população da Grande Vitória-ES.

O trabalho teve duas hipóteses formuladas. A primeira hipótese foi que os SNPs rs3764650 *ABCA7*, rs744373 *BIN1*, rs6656401 *CR1*, rs610932 *MS4A6A*, rs3865444 *CD33* e rs1800795 *IL-6* estão associados para DAE na população da Grande Vitória-ES. A segunda hipótese foi que os SNPs da via inflamatória (rs3764650 *ABCA7*, rs610932 *MS4A6A*, rs3865444 *CD33*, rs6656401 *CR1*, rs1800795 *IL-6* e rs1136000 *CLU*) e da via do metabolismo, tráfego e endocitose de lipídios (rs744373 *BIN1*, rs429358 e rs7412 *APOE*, rs3764650 *ABCA7* e rs1136000 *CLU*) interagem em pares em epistasia para associação para a DAE na população da Grande Vitória-ES.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Histórico da Doença de Alzheimer

Aloysius Alzheimer (Figura 1) foi um psiquiatra e neuropatologista (THOMAS; FENECH, 2007) que descreveu pela primeira vez alterações histopatológicas específicas, conhecidas hoje como emaranhados de neurofibrilas, e associá-las com uma forma de Demência que ficou conhecida como Doença de Alzheimer (DA), nomeada em sua homenagem. Aloysius nasceu em 14 de junho de 1864 em Marktbriet, Alemanha e estudou medicina na Universidade de Berlin (THOMAS; FENECH, 2007).

Em 1901, Aloysius tratou uma paciente chamada Auguste D. com 51 anos, admitida no Hospital Frankfurt, na Alemanha (Figura 1) (HIPPIUS; NEUNDÖRFER, 2003; THOMAS; FENECH, 2007). A paciente exibia vários sintomas psiquiátricos e de comportamento como desorientação, paranoia, alucinação, comprometimento de memória e da fala (MAURER; VOLK; GERBALDO, 1997), o que caracterizava um caso de Demência, que na época, era caracterizada por apresentar a característica de perda das faculdades mentais (ESQUIROL, 1838, apud MAURER; VOLK; GERBALDO, 1997). Depois de alguns anos, os sintomas da paciente se agravaram e 5 anos depois, Auguste faleceu (THOMAS; FENECH, 2007). Nessa época, Aloysius estava trabalhando no Instituto de Psiquiatria em Munique, que atualmente é o instituto Max Planck para pesquisa com Cérebro, no grupo de psiquiatras comandados por Emil Kraepelin, um médico psiquiatra alemão (SHORTER, 1997, apud CAIXETA, 2012). Aloysius requisitou que lhe enviassem o cérebro da paciente e os registros médicos feitos (THOMAS; FENECH, 2007). Após a análise do cérebro de Auguste, Aloysius observou várias alterações histopatológicas que diferiram dos processos patológicos conhecidos na época (THOMAS; FENECH, 2007).

Na 37ª Conferência de Psiquiatras da Alemanha, em 1906, Aloysius reportou pela primeira vez o caso clínico de Auguste e essas alterações histopatológicas (CAIXETA, 2012; THOMAS; FENECH, 2007) que foram depois denominadas de

emaranhados de neurofibrilas e placas amilóides, consideradas atualmente como os principais *hallmarkers* da doença. As placas amilóides haviam sido descobertas anteriormente mas não haviam sido associadas com DA. Os estudos divergem na atribuição do pesquisador que descobriu as placas inicialmente. Um estudo afirma ter sido Oscar Fisher em 1907 (FISHER, 1907, apud MAURER; VOLK; GERBALDO, 1997). Já outro estudo afirma ter sido Redlich em 1898 (LEIBING, 1998).

Em 1907, Aloisius publicou um artigo intitulado “*A characteristic serious disease of the cerebral cortex*” (ALZHEIMER, 1907, apud MAURER; VOLK; GERBALDO, 1997) no qual descreve seus estudos feitos com a paciente Auguste e desenhos do que observou no cérebro da paciente (Figura 1). Em 1910, Emil Kraepelin, mencionou pela primeira vez a doença como Doença de Alzheimer na publicação da 8ª edição do livro “*The Handbook of Psychiatry*”, como homenagem à Aloisius Alzheimer (KRAEPELIN, 1910, apud HIPPIUS; NEUNDÖRFER, 2003; THOMAS, FENECH, 2007). Além disso, separou a DA da Demência senil para classificá-la como Demência pré-senil, uma forma de Demência de início precoce (BOLLER; FORBES, 1998, apud CAIXETA, 2012).

Em 1968, DA ainda era considerada uma Demência pré-senil rara e a partir dos trabalhos de Blessed, Tomlinson e Roth (1968) , percebeu-se relação entre Demência da idade avançada com as alterações cerebrais características de DA e também que DA compartilhava o mesmo quadro clínico com Demência senil (BLESSED; TOMLINSON, ROTH, 1968, apud CAIXETA, 2012). Assim, os conceitos foram agrupados a partir de 1976 em “Demência senil do tipo Alzheimer” (CAIXETA, 2012).

Cento e onze anos se passaram desde que Aloisius fez a relação dos achados histológicos de DA com as alterações cognitivas e psicológicas em Auguste. No entanto, atualmente, a doença ainda não apresenta cura (HICKMAN; FAUSTIN; WISNIEWSKI, 2016).

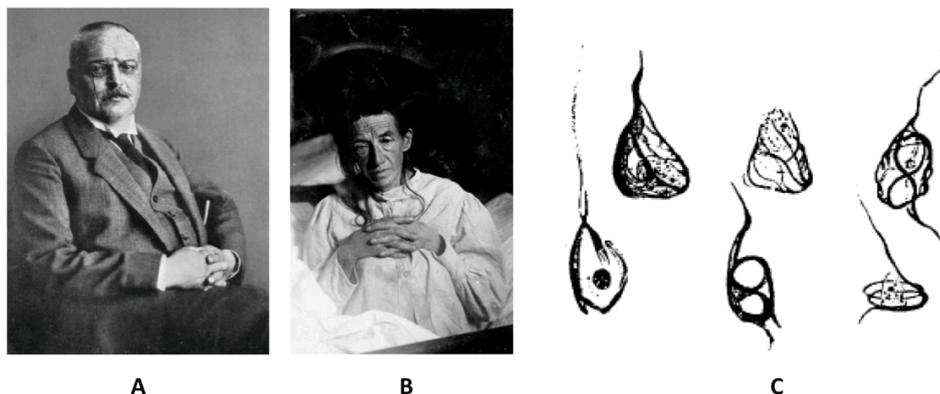


Figura 1: Fotos de Aloysius, seus desenhos e de Auguste. A) Médico alemão Aloysius Alzheimer (1864-1915); B) Paciente Auguste D. (1850-1906); C) Desenho de Aloysius Alzheimer dos emaranhados neurofibrilares observados no cérebro da paciente Auguste (Modificado de ALZHEIMER, 1991; THOMAS; FENECH, 2007).

2.2. Epidemiologia

A Doença de Alzheimer é considerada o tipo mais comum de Demência e esta apresenta a prevalência atualmente de 47 milhões de pessoas no mundo (HICKMAN; FAUSTIN; WISNIEWSKI, 2016). Segundo os dados de *World Health Organization* e *Alzheimer's Disease International*, em 2010, o Brasil esteve entre nove países que apresentaram o maior número de pessoas com Demência (Figura 2), com um milhão de afetados (WORLD HEALTH ORGANIZATION ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL, 2012). Em 2015, os dados de *Alzheimer's Association Report* mostraram que no continente asiático, 22,9 milhões de pessoas apresentaram demência, seguidos do continente europeu, com 10,5 milhões, continente americano com 9,4 milhões e continente africano com 4 milhões de afetados (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2015). É esperado para 2050 um número de 131,5 milhões de pessoas afetadas por Demência (Figura 3) (HICKMAN; FAUSTIN; WISNIEWSKI, 2016).

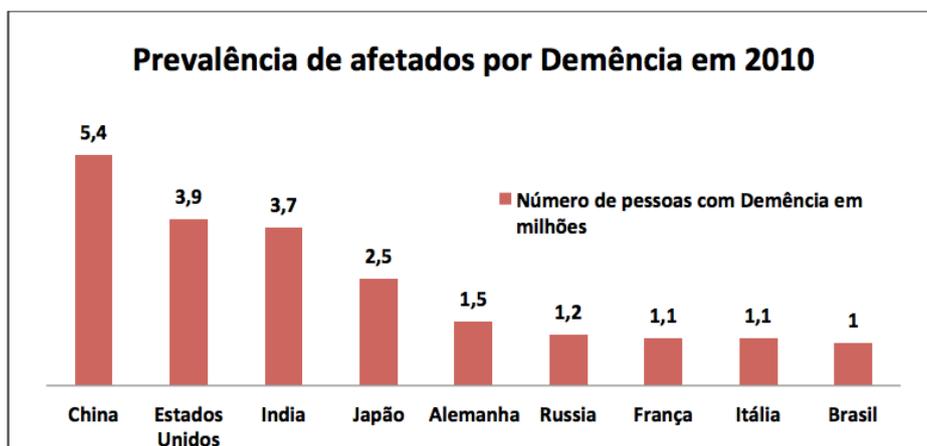


Figura 2: Prevalência da Demência nos países com maior número de afetados em 2010 (Modificado de WORLD HEALTH ORGANIZATION ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL, 2012).

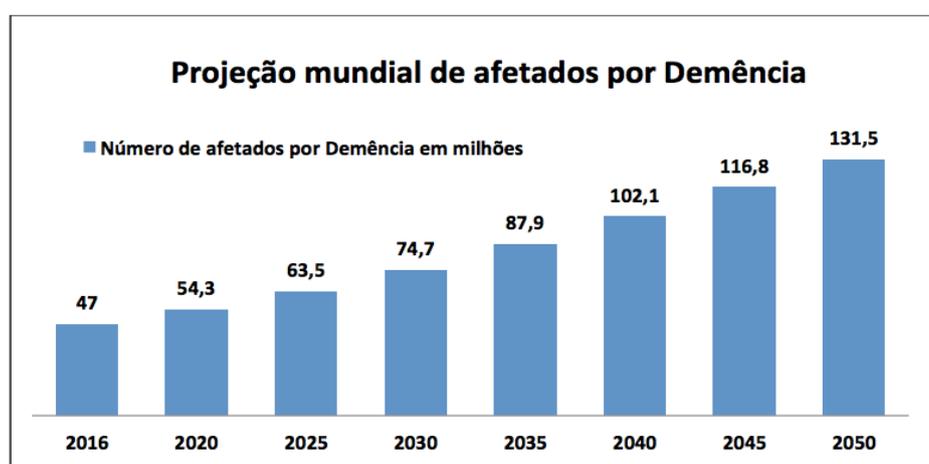


Figura 3: Projeção mundial de afetados por Demência (Modificado de ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2015).

A Doença de Alzheimer constitui aproximadamente 60 à 80% dos casos de Demência (ASSOCIATION, 2016) e é considerada a doença neurodegenerativa mais comum mundialmente (THOMPSON; VINTERS, 2012). É esperado um aumento no número de pacientes afetados pela DA com o aumento do envelhecimento da população, uma vez que a idade é um grande fator de risco para a doença. Além disso, a redução da taxa de natalidade e o avanço na medicina, que contribui para o aumento da expectativa de vida na população, também contribuem para o aumento de pacientes afetados (PRINCE et al., 2015; THOMPSON; VINTERS, 2012). Assim, a Doença de Alzheimer é considerada uma epidemia mundial em crescimento (HICKMAN; FAUSTIN; WISNIEWSKI, 2016).

No Brasil, não há uma estimativa concreta de pacientes afetados pela DA. No entanto, se tem uma coletânea de estudos sobre casos de Demência e Doença de Alzheimer. A maioria desses estudos foram realizados no estado de São Paulo (Tabela 1). Pode-se observar que DA foi considerada o tipo de Demência mais frequente nestes estudos (CAIXETA, 2012). Além disso, há o estudo de Nitrini et al. (2004) que realizou um estudo longitudinal com uma população de 1656 indivíduos acima de 65 anos de idade de Catanduva, SP. Este estudo teve início em 1997 e foram feitas análises de diagnóstico para Demência e Alzheimer em intervalos de anos com estes indivíduos. Com este estudo, Nitrini et al. (2004) reportou uma taxa de incidência de Demência de 13,8 em 1000 pessoas por ano enquanto que para DA, a incidência foi de 7,7 em 1000 pessoas ao ano.

Tabela 1: Estudos da Prevalência de Demência no Brasil (Modificado de VIEIRA; CAIXETA, 2012).

Estudos	Localidade	N	DA (%)
Nitrini e colaboradores (1995)	São Paulo, SP	100	54
Godoy, Tognola, Ferraz (1998)	São José do Rio Preto, SP	250	55.2
Herrera e colaboradores (2002)	Cantaduva, SP	118	54.7
Vale e Miranda (2002)	Ribeirão Preto, SP	104	33.6
Silva e Damasceno (2002)	Campinas, SP	261	23.7
Takada e colaboradores (2003)	São Paulo, SP	275	59.6
Scazufca e colaboradores (2008)	São Paulo, SP	105	32.4
Tascone e colaboradores (2008)	São Paulo, SP	113	62.8
Bottino e colaboradores (2008)	São Paulo, SP	107	59.8
Godinho e colaboradores (2010)	Porto Alegre, RS	105	60

N= número de casos de Demência; DA= Doença de Alzheimer

2.3. Histopatologia

A Doença de Alzheimer apresenta modificações macroscópicas e microscópicas nos cérebros dos pacientes afetados. As características macroscópicas observadas são as grandes atrofia cerebral com diminuição severa no peso do cérebro (abaixo de 1000 gramas), afetando regiões parietal-temporal e lobo frontal (BARKHOF et al., 2011). O tamanho cerebral em pacientes com DA se demonstrou ser de 8 à 15% menor que controles em estudos com controles pareados por idade e sexo (TERRY et al., 1981).

As características microscópicas observadas são as placas senis, que são modificações extracelulares e os emaranhados de neurofibrilas, que são

modificações intracelulares (THOMAS; FENECH, 2007). Ambas alterações são consideradas os grandes *hallmarkers* de DA. As placas senis ou placas amilóides são hipotetizadas como as primeiras alterações histopatológicas que ocorrem na Doença de Alzheimer (GEORGE, 2000). Elas são placas que apresentam agregados de peptídeos β amilóide de aminoácido 40 e 42 ($A\beta_{40}$ ou $A\beta_{40}$, $A\beta_{42}$ ou $A\beta_{42}$) gerados pela processamento anormal do gene *Proteína Precursora Amilóide (APP)*. Os peptídeos $A\beta$ são gerados dentro do neurônio para depois serem secretadas para fora, como peptídeos solúveis (THOMAS; FENECH, 2007). Os peptídeos $A\beta_{42}$ são neurotóxicos e induzem estresse oxidativo que podem danificar vários componentes celulares, o que leva à apoptose celular (CHRISTEN, 2000). As placas senis estão distribuídas predominantemente no córtex cerebral e se distribuem dentro de várias áreas neocorticais (MATTSON; KELLER; BEGLEY, 1998). Elas podem ser divididas em placas senis difusas e neuríticas (Figura 4). As placas senis difusas representam o início das lesões cerebrais em Alzheimer (MATTSON; KELLER; BEGLEY, 1998). Elas se apresentam de forma heterogênea em tamanho, sendo que há maior formação de placas menores do que as de tamanho maior, até 20 μ m de diâmetro (THEUNS et al., 2000). Já as placas neuríticas são lesões esféricas mais compactas e maiores, até 100 μ m de diâmetro e média de 30 μ m (THEUNS et al., 2000). Elas apresentam um núcleo central formado de filamentos de proteínas $A\beta$ e na periferia, há proteínas Tau e também proteínas $A\beta$ (CASTELLANI; ROLSTON; SMITH, 2011).

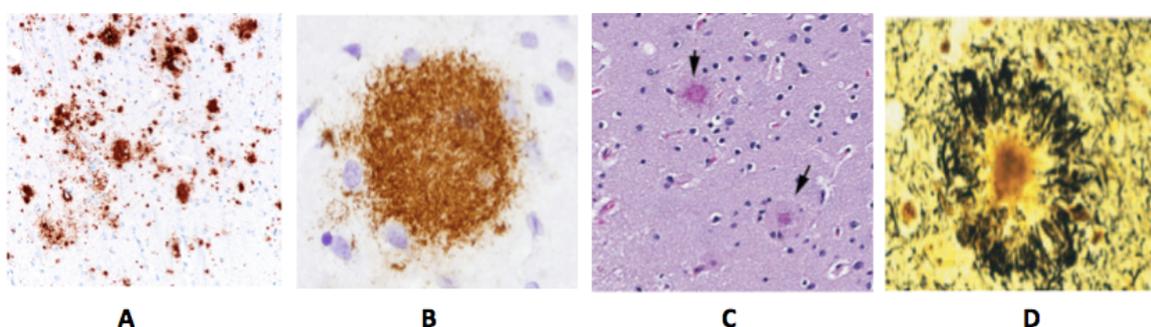


Figura 4: Imagens de microscópio de placas senis. A) e B) são imagens de placa senil do tipo difusa, sendo que em B) há destaque em uma placa. C) e D) são imagens de placa senil do tipo neurítica. Em C) as setas indicam as placas isoladas e em D) se dá destaque ao núcleo central e a periferia formada de filamentos Tau (Modificado de AGAMANOLIS, 2016; CASTELLANI; ROLSTON; SMITH, 2011; THOMAS; FENECH, 2007; VINTERS, 2015).

Os emaranhados de neurofibrilas (Figura 5) são formados dentro dos neurônios e estão localizados em diversas regiões do cérebro, principalmente em neurônios piramidais no hipocampo propriamente dito (Corno de Amon) e no neocórtex cerebral (BARKHOF et al., 2011). Além disso, são encontrados também no mesencéfalo, núcleo basal e hipotálamo (BRAAK; BRAAK, 1991). Dentro das células, a proteína Tau se associa com a proteína Tubulina para a formação dos microtúbulos. Os microtúbulos são importantes estruturas do citoesqueleto pois promovem estabilidade celular, transportes de partículas que permitem movimentação de nutrientes, neurotransmissores e organelas, essenciais para o funcionamento neuronal normal (BRION, 1998; THOMAS; FENECH, 2007). A proteína Tau, codificada pelo gene *Microtubule-associated protein tau (MAPT)*, se apresenta naturalmente em filamentos helicoidais pareados, sendo que cada filamento é formado de duas proteínas Tau entrelaçadas (PASTERNAK, 2007). No entanto, na Doença de Alzheimer, os filamentos de Tau estão hiperfosforilados (PASTERNAK, 2007). A hiperfosforilação de Tau é regulada por proteínas cinases como o Glicogênio sintase cinase 3 (GSK3), que atua nos resíduos dos aminoácidos serina e treonina da proteína Tau (PASTERNAK, 2007). A hiperfosforilação culmina na dissociação da ligação entre proteínas Tau e Tubulina, desestruturando os microtúbulos. Além disso, a proteína Tau se torna fibrilada e se deposita intracelularmente formando os emaranhados de neurofibrilas (Figura 6) (CASTELLANI; ROLSTON; SMITH, 2011). Com isso, os neurônios sofrem quebra do transporte cerebral, perda de sua atividade celular e por conseguinte, morte neuronal (BRION, 1998; CASTELLANI; ROLSTON; SMITH, 2011)

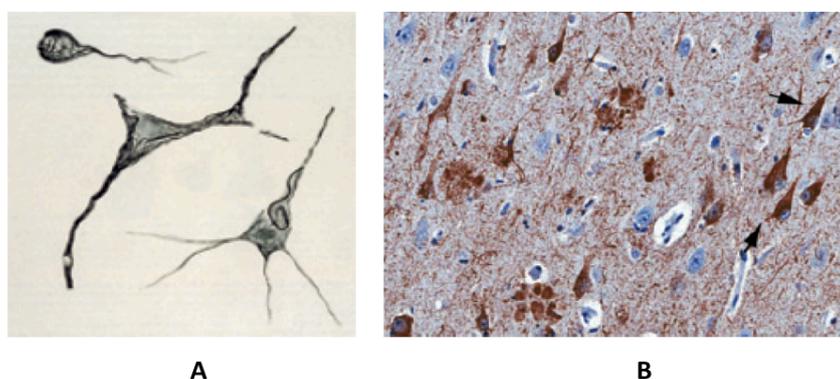


Figura 5: Imagens de emaranhados de neurofibrilas. A) Destaque para os emaranhados de neurofibrilas em neurônio piramidal. B) Imagem de microscópio com lâminas coradas por técnicas de imunistoquímica em que foi usado anticorpo primário para tau-hiperfosforilado, com alta

magnificação. Setas indicam neurônios com os emaranhados de neurofibrilas (Modificado de MASTERS et al., 2016; VINTERS, 2015).

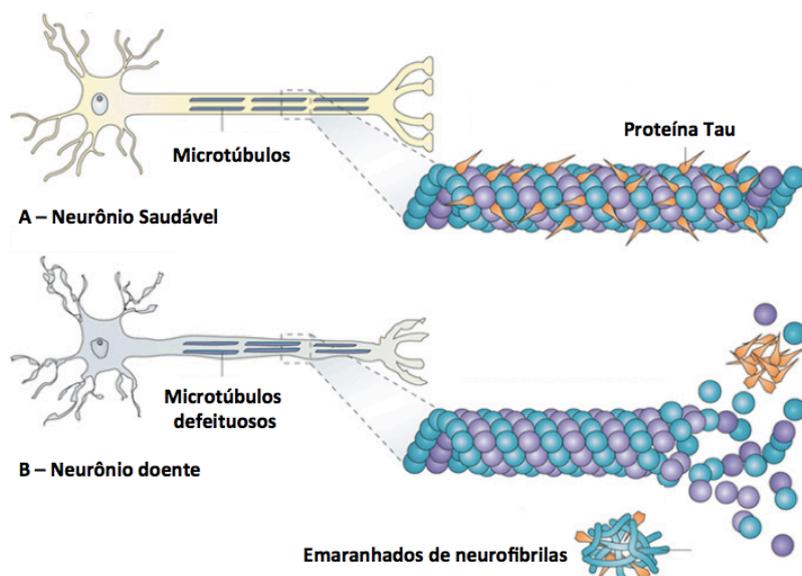


Figura 6: Imagem da formação de emaranhados de neurofibrilas. A) Imagem de um neurônio saudável mostrando a proteína Tau ligada aos microtúbulos os tornando estáveis. B) Imagem de um neurônio não saudável que mostra a dissociação da proteína Tau hiperfosforilada da Tubulina, que leva ao dissociação do microtúbulo e posteriormente, a formação dos emaranhados de neurofibrilas (Modificado de BRUNDEN; TROJANOWSKI; LEE, 2009).

2.4. Diagnóstico da Doença de Alzheimer

Os sintomas iniciais da Doença de Alzheimer incluem tipicamente dificuldade em lembrar nomes e eventos recentes, apatia e depressão (ASSOCIATION, 2016; RASKIN et al., 2015). Com a progressão da doença, há aparecimento de novos sintomas e agravamento dos antigos, como por exemplo, piora da memória, julgamento prejudicado, desorientação, confusão, mudanças de comportamentos, dificuldades para falar e andar (ASSOCIATION, 2016; RASKIN et al., 2015).

Na Doença de Alzheimer, o critério mais utilizado para diagnóstico é baseado no *NINCDS-ADRDA* (*National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association*) (MCKHANN et al., 1984, apud FROTA et al., 2011) por apresentar maior sensibilidade e especificidade (FROTA et al., 2011). Vários exames podem ser realizados para testar o nível cognitivo do paciente, como por exemplo, o *Mini-Mental State Examination* (MMSE) (FOLSTEIN; FOLSTEIN; MCHUGH, 1975, apud FROTA et al., 2011). O MMSE é um teste que avalia os aspectos cognitivos das

funções mentais através de questões em 7 categorias: orientação para tempo, orientação para local, registro de 3 palavras, atenção e cálculo, lembrança de 3 palavras, linguagem e capacidade construtiva visual (ALMEIDA, 1998). O escore do MMSE pode variar de 0 até 30 pontos, sendo que até 23/24 pontos se designa diagnóstico de demência (ALMEIDA, 1998).

Nos últimos anos, houveram avanços no entendimento da doença, como por exemplo, a capacidade de se detectar *in vivo* elementos fisiopatológicos de DA e com isso, novos critérios foram adicionados. Assim, de acordo com o grupo de trabalho do *National Institute on Aging (NIA)* e *Alzheimer's Association (AA)*, em 2009, o critério de diagnóstico para doença de Alzheimer foi revisado e pode ser diagnosticada em três estágios: Doença de Alzheimer pré-clínica, Comprometimento Cognitivo Leve devido à DA e Demência causada por DA (FROTA et al., 2011). As recomendações para o diagnóstico de DA no Brasil baseiam-se nesses avanços dos estudos nos últimos anos, de acordo com os membros do Departamento de Neurologia Cognitiva e do Envelhecimento da Academia Brasileira de Neurologia (FROTA et al., 2011).

Na Demência causada por DA, o paciente se encontra em um estágio clínico mais severo que pode interferir nas atividades diárias (ASSOCIATION, 2015). Nesse estágio, há a separação em três critérios clínicos centrais: Doença de Alzheimer Provável, Possível e Definitiva. A Doença de Alzheimer Provável e Possível apresentam vários critérios específicos para serem considerados. Por exemplo, na DA Provável, critérios como início da doença insidioso e história clara ou observação de piora cognitiva, além de déficits cognitivos iniciais (FROTA et al., 2011). Já na DA possível, por exemplo, segue critérios como quando o paciente apresenta um curso atípico da doença ou quando apresenta evidencias de outras etiologias (FROTA et al., 2011). A Doença de Alzheimer Definitiva é determinada quando além de preencher os critérios clínicos e cognitivos para Demência causada por DA, há a detecção *postmortem* (FROTA et al., 2011).

Na DA pré-clínica, o paciente não apresenta os sintomas da doença mas a mesma pode se encontrar ativa. Além disso, o diagnóstico dessa fase ainda se encontra restrito à pesquisa (FROTA et al., 2011). Na fase de Comprometimento Cognitivo

Leve devido à DA, o paciente apresenta um declínio cognitivo leve mas ainda está capacitado para realizar as atividades diárias (ASSOCIATION, 2015).

2.5. Genética da Doença de Alzheimer

A Doença de Alzheimer pode ser classificada geneticamente em dois tipos: Doença de Alzheimer Familiar e Esporádica.

2.5.1. Doença de Alzheimer Familiar

A Doença de Alzheimer Familiar (DAF) ou de DA de início precoce, representa 2% dos casos de Alzheimer. Ela acomete antes dos 65 anos de idade, geralmente entre 40 e 50 anos e é monogênica com padrão de herança autossômico dominante (BERTRAM; LILL; TANZI, 2010; HOLTZMAN; MORRIS; GOATE, 2011). Mutações em três genes foram associados com a DAF: *Proteína Precursora Amilóide (APP)*, *Presenilina 1 (PSEN1)* e *Presenilina 2 (PSEN2)* (NUSSBAUM; ELLIS, 2003).

O gene *APP* está localizado no cromossomo 21q21 enquanto que os genes *PSEN1* e *PSEN2* estão localizados nos cromossomos 14q24.3 e 1q31-q42, respectivamente (Figura 7) (NUSSBAUM; ELLIS, 2003). A proteína APP, codificada pelo gene *APP*, é uma glicoproteína integral de superfície celular neuronal que tem papel em adesão celular, função sináptica e indução de apoptose (SUH; CHECLER, 2002). Os genes *PSEN1* e *PSEN2* formam as proteínas pré-senilinas 1 e 2, respectivamente, que participam na formação da enzima γ -secretase juntamente com as proteínas *Nicastrin*, *Anterior pharynx-defective 1* e *Presenilin enhancer 2* (SUH; CHECLER, 2002). A γ -secretase é um complexo heterotetrâmico multi-enzimático que atua no processamento da proteína APP (SUH; CHECLER, 2002).

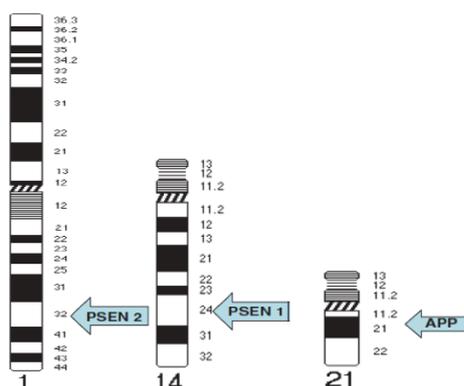


Figura 7: Localização dos genes *APP*, *PSEN1* e *PSEN2* nos cromossomos (Modificado de THOMAS; FENECH, 2007).

A proteína APP passa por um processamento que ocorre através de duas vias: via não-amiloidogênica e amiloidogênica (AVRAMOPOULOS, 2009; THOMAS; FENECH, 2007). A via não-amiloidogênica (Figura 8) ocorre em condições normais e tem atuação das enzimas proteolíticas α -secretase e γ -secretase. A α -secretase pertence a família da *A Disintegrin And Metalloproteinase* (ADAM) e três membros dessa família de enzimas como ADAM9, ADAM10 e ADAM17 apresentam atividade de α -secretase (POSTINA, 2008). Esta enzima cliva a proteína APP e forma um fragmento solúvel APP α (sAPP α) e um fragmento residual C-terminal de 83 aminoácidos (CT₈₃) que fica ancorado na membrana celular (AVRAMOPOULOS, 2009; THOMAS; FENECH, 2007). Por conseguinte, a γ -secretase cliva o CT₈₃, e produz um peptídeo de 3-kDa chamado p3 e um fragmento C-terminal de 57 à 59 aminoácidos (CT₅₇₋₅₉), que é um domínio amilóide intracelular (AICD) (AVRAMOPOULOS, 2009; THOMAS; FENECH, 2007).

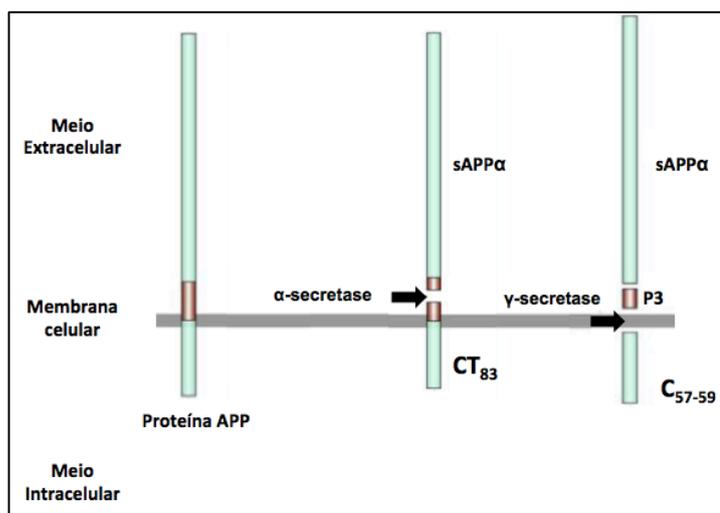


Figura 8: Via não-amiloidogênica da proteína APP (Modificado de AVRAMOPOULOS, 2009).

Na via amiloidogênica (Figura 9), a proteína APP é clivada pela β -secretase e γ -secretase. A enzima β -secretase ou BACE (*β site APP cleaving enzyme*) cliva APP formando um fragmento solúvel APP β (sAPP β) e um fragmento residual C-terminal de 99 aminoácidos (CT₉₉) (AVRAMOPOULOS, 2009; NUSSBAUM et al., 2016; SUH; CHECLER, 2002; THOMAS; FENECH, 2007). Em seguida, a γ -secretase cliva o CT₉₉, formando o fragmento de peptídeo A β e CT₅₇₋₅₉ (AVRAMOPOULOS, 2009; NUSSBAUM et al., 2016; SUH; CHECLER, 2002; THOMAS; FENECH, 2007).

A γ -secretase forma dois tipos de peptídeo β amilóide: A β ₄₀ e A β ₄₂. Ambos peptídeos estão presentes na placa senil (JARRETT; BERGER; LANSBURY, 1993). O A β ₄₀ é formado em grande quantidade e é a forma não tóxica do peptídeo β amilóide (JARRETT; BERGER; LANSBURY, 1993). O A β ₄₂ é formado em pequena quantidade, é a forma neurotóxica e é mais hidrofóbico, o que o torna mais suscetível para formar fibras e se condensar em conjunto com outras fibras na formação das placas (JARRETT; BERGER; LANSBURY, 1993).

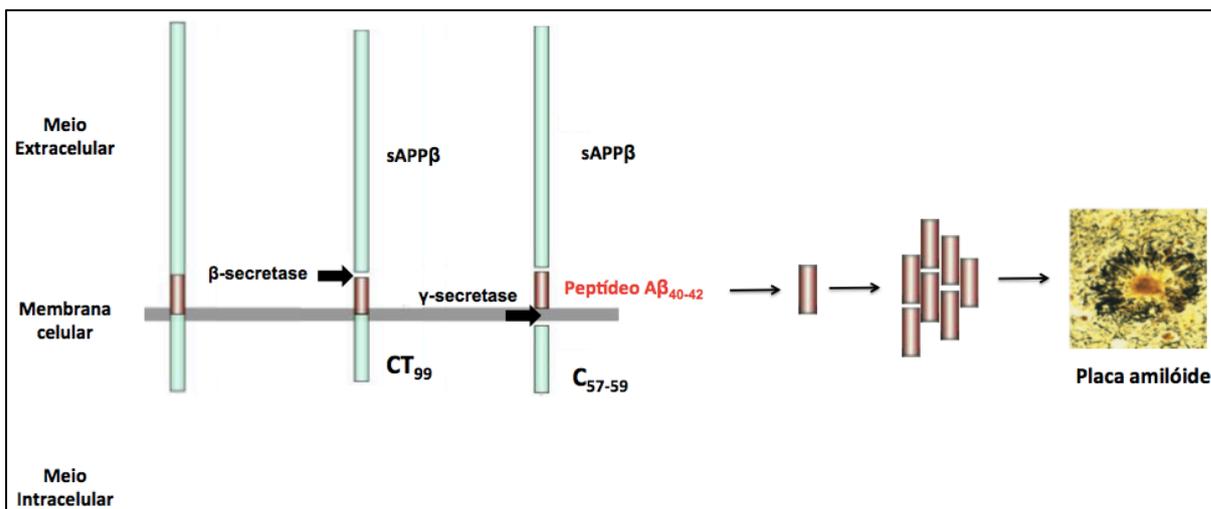


Figura 9: Via amiloidogênica. O produto final da proteína A β pode se condensar e levar a formação das placas amiloides (Modificado de AVRAMOPOULOS, 2009; THOMAS; FENECH, 2007).

Mutações nos genes *PSEN1*, *PSEN2* e *APP* aumentam a atividade de proteólise de γ -secretase, o que leva ao aumento da formação de A β_{42} (CAI; GOLDE; YOUNKIN, 1993; CITRON et al., 1992; SUZUKI et al., 1994). Nos últimos vinte anos, a hipótese proposta mais aceita para explicar o desenvolvimento da DA é a hipótese da cascata amilóide que propõe que o processo neurodegenerativo é uma série de eventos causados por esse processamento anormal da proteína APP, isto é, hipotetizado pela presença das mutações que aumentam a atividade da γ -secretase, e a fosforilação da proteína Tau (HARDY; HIGGINS, 1992).

2.5.2. Doença de Alzheimer Esporádica

A Doença de Alzheimer Esporádica (DAE) ou DA de início tardio tem etiologia multifatorial com influência de fatores genéticos e ambientais. Ela ocorre após os 65 anos de idade e representa 98% dos casos de Alzheimer (YU; TAN; HARDY, 2014). De acordo com Walsh e Selkoe (2004), a DAE tem a prevalência aumentada com o envelhecimento e é idade dependente. A DAE acomete 1 a 3% da população com idade de 60 anos, 3 à 12% dos idosos com 70 à 80 anos e 25% à 35% dos indivíduos com 85 anos ou mais (WALSH; SELKOE, 2004). Até o momento, o alelo $\epsilon 4$ do gene *Apolipoproteína E (APOE)* é considerado o maior fator de risco genético para DAE em diversas populações distintas no mundo e a presença de pelo menos um alelo $\epsilon 4$ pode aumentar em 3 vezes o risco para DAE (LAMBERT; AMOUYEL,

2011; NUSSBAUM et al., 2016; STRITTMATTER et al., 1993).

O gene *APOE* está localizado no cromossomo 19q13.2 e codifica a proteína APOE que apresenta três isoformas: ApoE2, ApoE3 e ApoE4 (MORGAN; CARRASQUILLO, 2013). O gene *APOE* apresenta os polimorfismos rs429358 e rs7412. Combinações desses dois polimorfismos definem as três isoformas através de haplótipos: ϵ 2 (alelo T de rs7412 e alelo T de rs429358) que forma a isoforma ApoE2, ϵ 3 (alelo C de rs7412 e alelo T de rs429358) para ApoE3 e ϵ 4 (alelo C de rs7412 e alelo C de rs429358) para ApoE4 (MORGAN; CARRASQUILLO, 2013).

A proteína APOE é a maior apolipoproteína no cérebro que carrega colesterol entre as células cerebrais (EL GAAMOUCHE et al., 2016). Ela pode se acoplar à lipídios e se ligar ao peptídeo A β para direcioná-lo à sua eliminação do sistema nervoso central (TOKUDA et al., 2000). Além disso, em estudos populacionais, o alelo ϵ 4 foi considerado fator de risco na população de Vitória, ES (ALMADA et al., 2012).

2.5.3. Novos genes associados à Doença de Alzheimer Esporádica

Na Doença de Alzheimer Esporádica, menos de 50% dos casos são referentes ao alelo ϵ 4 do gene *APOE* (HOLLINGWORTH et al., 2011b). Isto sugere que há outras variáveis genéticas relacionadas com DAE. Assim, os estudos estão centrados em busca de mais genes que correspondam a DAE (BERTRAM, 2009).

Nos últimos onze anos, estudos com *Genome-wide association study* (GWAS) reportaram novos genes com polimorfismos de nucleotídeo único (SNP - *Single Nucleotide Polymorphism*) associados como fatores de risco à Doença de Alzheimer Esporádica (Figura 10 e Tabela 2). Os estudos de GWAS analisam as variações na sequência do DNA no genoma humano para identificar novos fatores de risco para doenças como a DA (BUSH; MOORE, 2012). Das variantes descobertas, o SNP rs3764650 em *ABCA7*, rs744373 em *BIN1* e rs6656401 em *CR1* foram consideradas fatores de risco genético para DAE enquanto que rs610932 em *MS4A6A*, rs3865444 em *CD33* e rs1136000 em *CLU* foram consideradas fatores de proteção (HAROLD et al., 2009; HOLLINGWORTH et al., 2011a; KARCH; GOATE, 2014; LAMBERT et

al., 2009; NAJ et al., 2011). Com exceção do gene *BIN1*, todos os novos genes citados apresentam fortes indícios de papel na via inflamatória que leva à Doença de Alzheimer (KARCH; GOATE, 2014). Outro gene também relacionado com papel inflamatório e com associação para DAE é o gene *IL-6* e seu polimorfismo rs1800795. Todas essas 7 variáveis tem sido estudadas em estudos de associação em diversas populações, como Caucasianas e Asiáticas (KARCH; GOATE, 2014).

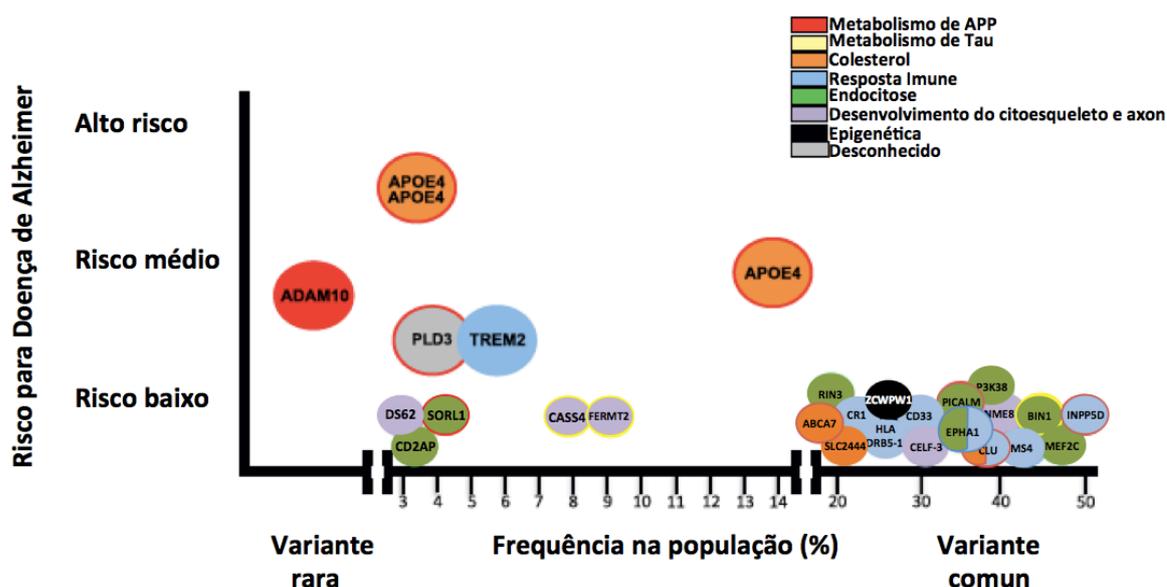


Figura 10: Variante de risco para Doença de Alzheimer em novos genes reportados por estudos GWAS. Além das variantes reportadas por GWAS há também na imagem variantes já estudadas. As cores estão relacionadas com possíveis papéis dos genes na DA (Modificado de KARCH; GOATE, 2014b).

Tabela 2: Genes associados com DA em estudos GWAS.

SNP Gene	Localização no gene	AMF	Estudo GWAS	OR (IC 95%)	Valor de p
rs3764650 <i>ABCA7</i>	Cro. 19, íntron	G	^a Hollingworth et al. (2011a)	1,22 (1,13-1,32)	$2,9 \times 10^{-7}$
rs610932 <i>MS4A6A</i>	Cro. 11, 3' <i>downstream</i>	A	^a Hollingworth et al. (2011a)	0,91 (0,87-0,95)	$2,1 \times 10^{-5}$
rs11136000 <i>CLU</i>	Cro. 8, íntron	T	^b Harold et al. (2009)	0,84 (0,79-,89)	$1,4 \times 10^{-9}$
rs3764650 <i>BIN1</i>	Cro. 2, íntron	C	^b Harold et al. (2009)	1,17 (1,09-1,25)	$3,2 \times 10^{-6}$
rs6656401 <i>CR1</i>	Cro. 1, íntron	A	^c Lambert et al. (2009)	1,21 (1,14-1,29)	$3,5 \times 10^{-9}$
rs386544 <i>CD33</i>	Cro.19, 5' <i>upstream</i>	T	^d Naj et al. (2011)	0,89 (0,86-0,93)	$2,0 \times 10^{-7}$

Cro. = Cromossomo; AMF= Alelo de menor frequência; ^aDados do estágio 3 do estudo de GWAS testados em uma amostra de 8.286 pacientes e 21.258 controles em populações caucasianas; ^bDados do estágio 1 do estudo de GWAS testados em uma amostra de 3.941 pacientes e 7.848 controles e populações caucasianas; ^cDados do estágio 1+2 do estudo de GWAS testados em uma amostra caucasiana de 5.905 pacientes e 8.526 controles; ^dDados do estágio 1+2 do estudo de GWAS testados em uma amostra caucasiana de 7.650 pacientes e 25.839 controles.

2.5.3.1. Gene ABCA7

O gene *ATP-binding cassette transporter A7 (ABCA7)* está localizado no cromossomo 19p13.3 e faz parte da família dos transportadores ABC (VASILIOU; VASILIOU; NEBERT, 2009). Ele codifica a proteína ABCA7 que tem papel de transportar lipídios entre as membranas celulares usando hidrólise do ATP (VASILIOU; VASILIOU; NEBERT, 2009).

O mecanismo molecular de atuação do gene na DA ainda é desconhecido. O estudo de Kim et al. (2013) realizou experimento *in vitro* que mostrou macrófagos de camundongo *Abca7^{-/-}* com redução em englobar peptídeo A β . Além disso, o mesmo estudo realizou também experimentos *in vivo* com camundongos modelos J20 de DA com *Abca7^{-/-}*, isto é, camundongos com gene APP humano com expressão aumentada e duas mutações em genes da DAF. O estudo mostrou que estes camundongos tiveram aumento em níveis de peptídeos A β . Como a proteína ABCA7 é expressa em células de micróglia, (LEE; LANDRETH, 2010), é possível sugerir que ABCA7 participa na eliminação de peptídeos A β na DA. Além disso, o estudo *in vivo* de Sakae et al. (2016) mostrou que camundongos *APP/PS1;Abca7^{-/-}*, que são camundongos transgênicos com deleção do gene ABCA7 e mutação nos genes *APP* e *PSEN1*, tiveram níveis aumentados da proteína SREBP2 (*Sterol regulatory element-binding protein 2*) e BACE1, um tipo de enzima β -secretase. Como SREBP2 é um fator de transcrição de BACE1, estes resultados mostram que ABCA7 pode regular a atividade de SREBP2-BACE1 e sugere uma participação no processamento da proteína APP.

O polimorfismo rs3764650 T>G no gene *ABCA7* apresenta o alelo G como fator de risco em estudos GWAS (HOLLINGWORTH et al., 2011a). O estudo de Shulman et al. (2013) estudou relação de genes de risco reportados em GWAS com medidas de imagens de *Pittsburgh compound B-Positron Emission Tomography (PIB-PET)*. Nesse estudo foi encontrado que o alelo G de rs3764650 em *ABCA7* foi associado com aumento na formação de placas neuríticas em cérebros, o que sugere uma relação entre esse polimorfismo e DA.

2.5.3.2. Gene CD33

O gene *Cluster of differentiation 33 (CD33)* é da família das lectinas tipo imunoglobulina de ligação ao ácido siálico e está localizado no cromossomo 19q13.33 (CROCKER; PAULSON; VARKI, 2007). Este gene expressa a proteína CD33 em células hematopoiéticas e fagocíticas, como as células de micróglia (CROCKER; PAULSON; VARKI, 2007). CD33 é uma proteína transmembranal com domínio de reconhecimento de ácido siálico (JIANG et al., 2014). Esta proteína apresenta duas isoformas: uma com tamanho total da proteína e outra com ausência do exon 2 que codifica o domínio de reconhecimento de ácido siálico (SALMINEN; KAARNIRANTA, 2009). Este domínio é importante para mediar as interações entre células do sistema imune (JANDUS; SIMON; VON GUNTEN, 2011) e permite que o CD33 se ligue a patógenos para direcioná-los à endocitose e eliminação do sistema imune (VIMR et al., 2002).

Várias evidências associam o gene *CD33* com a Doença de Alzheimer. O estudo de Walker et al. (2015) encontrou aumento elevado de proteínas de CD33 em cérebros de pacientes com DA. Além disso, também encontrou uma correlação entre nível de RNA mensageiro de CD33 com placas amilóides e emaranhados de neurofibrilas.

Os estudos de GWAS reportaram que o alelo T de rs3865444 G>T em *CD33* é um alelo de proteção para DA (HOLLINGWORTH et al., 2011a; NAJ et al., 2011). Desde então, vários estudos funcionais tentam entender a relação do SNP com DA. O estudo de Walker et al. (2015) encontrou que portadores do genótipo TT de rs3865444 tiveram expressão elevada da isoforma de CD33 que não tem o exon 2. Já o estudo de Griciuc et al. (2014) fez experimentos em *ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)* com *peptídeos A β* do córtex frontal de controles e pacientes com DA. Este trabalho encontrou que portadores do alelo T mostraram redução nos níveis de A β ₄₂ em comparação aos portadores do alelo G, o alelo de maior frequência. Assim, com base nos resultados desses estudos, pode-se sugerir que portadores do alelo T poderiam promover efeito protetor contra neurodegeneração em DA, através da expressão da isoforma de CD33 com ausência do exon 2. Com isso, poderia permitir que a célula fagocítica que expresse CD33 em sua superfície

englobe A β ₄₂, evidenciando o papel neuroprotetor do SNP na DA.

2.5.3.3. Gene *MS4A6A*

O gene *Membrane-spanning 4-domains subfamily A6A (MS4A6A)* está localizado no cromossomo 11q12.1 e faz parte da família de genes *MS4A* que são proteínas de superfície celular (LIANG et al., 2001). O gene codifica uma proteína MS4A6A que é expressa em células hematopoiéticas e no sistema nervoso central (LIANG; TEDDER, 2001).

Em 2011, estudos GWAS reportaram que o alelo A do SNP rs610932 C>A nesse gene tem efeito protetor para DAE (HOLLINGWORTH et al., 2011a; NAJ et al., 2011). Desde então, vários estudos tentam entender seu papel em DA mas ainda não está claro o papel do gene e de sua família. O estudo de Martiskainen et al. (2015) correlacionou a expressão de MS4A6A com o nível de emaranhados de neurofibrilas em cérebros *postmortem*. Quanto ao SNP rs610932, o estudo de Ma et al. (2014a) analisou a associação SNPs com imagens de ressonância magnética em estruturas cerebrais. Este estudo encontrou que portadores do alelo A em rs610932 tiveram redução de taxas de atrofia cerebral de área específicas do cérebro depois de um ano de acompanhamento. O estudo de Ramirez et al. (2016) realizou experimento parecido mas para área do hipocampo e encontrou que o alelo A tem efeito protetor contra neurodegeneração no hipocampo. Com isso, pode-se sugerir que o alelo A em rs610932 pode apresentar um efeito protetor contra a neurodegeneração na DA.

2.5.3.4. Gene *CR1*

O gene *Complement receptor 1 (CR1)* é um receptor para componentes complementos C3b e C4b e está localizado no cromossomo 1q32 (WEIS et al., 1987). O gene codifica a proteína Cr1 que é expressa em células fagocíticas e microgliais. Esta proteína pode regular o sistema complemento através da eliminação de complexos do sistema imunológico e células mortas (MORGAN; CARRASQUILLO, 2013; ROGERS et al., 2006).

O papel do gene na DA ainda é desconhecido. Estudos mostraram que a proteína CR1 pode se ligar ao peptídeo $A\beta_{42}$ através de seu sítio de ligação C3b e direcionar para a eliminação do mesmo (ROGERS et al., 2006). Com isso, pode-se considerar que CR1 poderia ter um papel protetor contra DA. No entanto, esse sistema pode-se encontrar defeituoso em pacientes com DA (MA et al., 2014b). Além disso, a proteína CR1 foi encontrada, em estudos realizados, com baixa expressão, o que resultaria em mais acumulação do peptídeo $A\beta_{42}$ devido a ineficiência em limpeza desse peptídeo (CREHAN et al., 2012).

Em estudos GWAS, o alelo A do SNP rs6656401 G>A foi associado à fator de risco com DAE (LAMBERT et al., 2009). Para entender a relação do SNP com DA, um estudo relacionou o polimorfismo com placas amilóides e encontrou que o alelo A do rs6656401 estava associado ($p=0.009$) com a deposição de placas neuríticas em análises de cérebros *post-mortem* (CHIBNIK et al., 2011). Além disso, o genótipo AA de rs6656401 foi correlacionado com a isoforma CR1*2, que é uma das 4 isoformas de CR1 que contém mais sítio de ligação C3b e é menos expressa que as outras isoformas (AIYAZ et al., 2012; MAHMOUDI et al., 2015). Como o alelo A é considerado um fator de risco para DAE, pode-se sugerir que talvez a baixa expressão da isoforma CR1*2 em pacientes portadores desse alelo poderia levar à eliminação defasada do peptídeo $A\beta_{42}$ e por conseguinte, sua acumulação no cérebro, relacionando assim, seu papel em DA.

2.5.3.5. Gene *BIN1*

O gene *Bridging integrator 1 (BIN1)* está localizado no cromossomo 2q14.3 e faz parte da família de genes BAR (*Bin/Amphiphysin/Rvs*) que está envolvida em processos de endocitose e apoptose celular (REN et al., 2006). Este gene codifica a proteína BIN1 que tem expressão aumentada em células musculares e neurais (WECHSLER-REYA et al., 1997). Além disso, a proteína BIN1 está relacionada com tráfego intracelular endossomal e endocitose mediada por clatrina (PANT et al., 2009).

Diversos estudos tentaram entender o papel de *BIN1* na DA. O estudo de Chapuis (2013) encontrou níveis elevados da proteína BIN1 em cérebros de pacientes com DA. No mesmo estudo, observou interação de BIN1 com a proteína Tau em análise *in vivo* e *in vitro*, o que pode-se sugerir um papel na via de processamento de Tau. Além disso, o BIN1 é hipotetizado auxiliar indiretamente na limpeza de peptídeos A β ₄₂ na DA (DONG et al., 2017; PANT et al., 2009).

O polimorfismo rs744373 T>C no gene *BIN1* apresenta o alelo C como fator de risco para DAE em GWAS (HAROLD et al., 2009). O estudo de Schmidt et al. (2012) tentou estudar a relação entre esse SNP e DA. Como resultado, o estudo encontrou uma relação entre pacientes com DA, portadores do alelo C do SNP, com perda de pontos no MMSE. Assim, este estudo mostra uma relação do polimorfismo com declínio cognitivo e progressão de DA.

2.5.3.6. Gene *CLU*

O gene *Clusterin (CLU)* está localizado no cromossomo 8p21.1 e codifica uma proteína Apolipoprotein J (APOJ) ou CLU que é considerada uma proteína transportadora de colesterol como o APOE (RIZZI et al., 2009). O gene *CLU* atua na apoptose, regulação de sistema complemento, proteção de membrana celular e interação entre células (KARCH; GOATE, 2014). Além disso, a proteína CLU pode se ligar a lipídios como o colesterol formando um complexo para seu transporte no cérebro (DONG et al., 2017; HARDY, 2002).

Vários estudos relacionaram seu papel na DA. No entanto, não se sabe ainda qual o seu mecanismo molecular nesta doença. Outro estudo mostrou que foi encontrado em cérebros de pacientes com DA um aumento elevado da proteína CLU (SCHRIJVERS et al., 2011). No entanto, essa proteína foi encontrada em taxas baixas na presença do alelo ϵ 4 de APOE em cérebros de pacientes com DA (HARR et al., 1996). Por isso, não se sabe ao certo se esse gene promove proteção à DA pelo aumento ou não de sua expressão proteica.

Em estudo GWAS, o alelo T do rs11136000 C>T no gene *CLU* foi considerado fator

de proteção à DAE (HAROLD et al., 2009; LAMBERT et al., 2009). O estudo de Schurmmann et al. (2011) identificou que o alelo T foi associado com baixas taxas da proteína CLU em portadores do genótipo TT. No entanto, ainda não se sabe ao certo o mecanismo de atuação deste polimorfismo em DA.

2.5.3.7. GENE *IL-6*

O gene *Interleukin 6 (IL-6)* está localizado no cromossomo 7p21 e faz parte da família das citocinas. Ele codifica uma proteína *IL-6* que está envolvida em doenças inflamatórias e no desenvolvimento de respostas imunológicas específicas (KELLER; WANAGAT; ERSHLER, 1996).

Vários estudos sugerem um papel para *IL-6* em DA. O estudo de Huell et al. (1995) encontrou um aumento das taxas de *IL-6* no cérebro em estágios iniciais de formação de placas amilóides. Além disso, o estudo de Licastro et al. (2003) detectou altas taxas de *IL-6* em cérebros de pacientes com DA. Assim, pode-se sugerir uma relação de *IL-6* com a Doença de Alzheimer (WILSON; FINCH; COHEN, 2002).

O SNP rs1800795 G>C está localizado na região promotora do gene (-174) e apresentou associação para a DAE em diversos estudos populacionais (BERTRAM et al., 2007). Estudos mostraram que este SNP pode alterar a taxa de transcrição do gene em pacientes com DA, o que evidencia uma relação de *IL-6* com a doença (KELLER; WANAGAT; ERSHLER, 1996).

2.6. Possíveis novas vias metabólicas na Doença de Alzheimer

Sabe-se que a hipótese central para o processo neurodegenerativo da DA é a hipótese da cascata amilóide pelo qual o evento principal é a formação das placas amilóides (HEPPNER; RANSOHOFF; BECHER, 2015). No desenvolvimento dessas placas há o aumento na formação de peptídeos $A\beta_{42}$ pelo processamento anormal da proteína APP (HEPPNER; RANSOHOFF; BECHER, 2015). No entanto, não apenas o aumento na formação de peptídeos $A\beta_{42}$ mas também a diminuição da

taxa de eliminação desses peptídeos do sistema nervoso apresentam um papel no desenvolvimento da DA (HEPPNER; RANSOHOFF; BECHER, 2015).

Recentes estudos sugerem que o colesterol e células do sistema imune participam na limpeza de peptídeos A β ₄₂ do sistema nervoso (KOJRO et al., 2001; O'BRIEN; WONG; EDU, 2011; REITZ, 2013). Com isso, outras vias patológicas à DA estão sendo exploradas (HEPPNER; RANSOHOFF; BECHER, 2015), como a via do metabolismo, tráfego e endocitose de lipídios e via inflamatória. Além disso, os resultados de GWAS com novos genes candidatos e suas variantes associadas à DA, como por exemplo, rs744373 *BIN1*, rs11136000 *CLU*, rs3764650 *ABCA7*, rs610932 *MS4A6A*, rs6656401 *CR1* e rs3865444 *CD33*, reforçam a hipótese dessas possíveis novas vias metabólicas na patogenia da Doença de Alzheimer.

2.6.1. Via do metabolismo, tráfego e endocitose de lipídios

O cérebro é o órgão mais rico em colesterol, apresentando 25% do total desse lipídio no corpo (EL GAAMOUCHE et al., 2016). O colesterol é um componente importante na bainha de mielina e da estrutura e função da membrana de células. Ele está presente em neurônios, astrócitos e células de micróglia (DONG et al., 2017; EL GAAMOUCHE et al., 2016). Em neurônios, o colesterol é essencial para suas funções e para plasticidade neuronal. Estas tarefas são importantes para o processamento de aprendizagem e formação de memória, aspectos encontrados defasados na patogenia da DA (PFRIEGER, 2003).

A atuação do colesterol na Doença de Alzheimer ainda não é totalmente elucidada. No entanto, vários estudos apoiam seu envolvimento na patogenia (KOJRO et al., 2001; O'BRIEN; WONG; EDU, 2011; REITZ, 2013). Defeitos na homeostase do colesterol, seja na síntese ou fluxo entre células cerebrais, estão relacionados com DA (PAOLO; KIM, 2012). Por exemplo, a isoforma ApoE4 do gene *APOE*, que transporta colesterol no cérebro, foi reportada como aumentar o nível total de colesterol no soro (PAOLO; KIM, 2012). Consequentemente, isso resulta em estresse oxidativo para os neurônios e, por conseguinte, morte neuronal, que é

observado em DA (EL GAAMOUCHE et al., 2016; NOTKOLA et al., 1998; SING; DAVIGNON, 1985).

O colesterol no cérebro pode tanto regular a produção como eliminação de peptídeos A β formados (DONG et al., 2017). Por exemplo, o excesso de colesterol na membrana celular pode diretamente modular as enzimas β -secretases e γ -secretases que são responsáveis pela clivagem do gene APP na via amiloidogênica em DA, produzindo mais peptídeos A β_{42} no cérebro (OSENKOWSKI et al., 2008; SHOBAB; HSIUNG; FELDMAN, 2005).

A via do metabolismo, tráfego e endocitose do colesterol apresenta um papel importante na eliminação de peptídeos A β sintetizados no cérebro (DONG et al., 2017; TAN; YU; TAN, 2013). Nessa via, tem-se a atuação de várias proteínas, como por exemplo, as proteínas dos genes *APOE*, *CLU*, *ABCA7* e *BIN1*.

A eliminação dos peptídeos A β no cérebro apresentam vários mecanismos, como por exemplo, pelas células de neurônios, astrócitos e glias, pela barreira hematoencefálica e pelo transporte para o líquido cefalorraquidiano (Figura 11). Nas células cerebrais e na barreira hematoencefálica há receptores LPR1 (*Low-density lipoprotein receptors-related protein 1*) e LPR2 (*Low-density lipoprotein receptors-related protein 2*) que são expressos na superfície. Esses receptores atuam na absorção dos complexos formados pelas proteínas APOE e CLU. (DONG et al., 2017; HARDY, 2002). O APOE pode se ligar ao colesterol através de proteínas como o ABCA1 (*ATP-binding cassette transporter A1*) (CHAN et al., 2008; KIM; WEICKERT; GARNER, 2008). Essas são proteínas responsáveis pelo fluxo de lipídio para apolipoproteínas e capacita a eficiência de APOE de se ligar à peptídeos A β . Além da ABCA1, a proteína ABCA7 é hipotetizada atuar com mesma função (CHAN et al., 2008; KIM; WEICKERT; GARNER, 2008). Com isso, o APOE ligado com o colesterol pode se ligar aos peptídeos A β , formando um complexo (DONG et al., 2017). A proteína CLU pode também se ligar ao peptídeos A β para direcioná-lo à eliminação do sistema nervoso (YU; TAN, 2012). Nas células cerebrais, a endocitose do complexo formado por APOE e por CLU pode ocorrer com a mediação da proteína BIN1 para direcionar o peptídeos A β à degradação dentro das células (DONG et al., 2017; PANT et al., 2009; TAN; YU; TAN, 2013). Na barreira

hematoencefálica, a absorção de ambos os complexos é sugerido ser facilitado também pela proteína BIN1 que medeia a formação de vesículas formadas de clatrina para transportar os peptídeos A β para a eliminação sistêmica (YU; TAN, 2012).

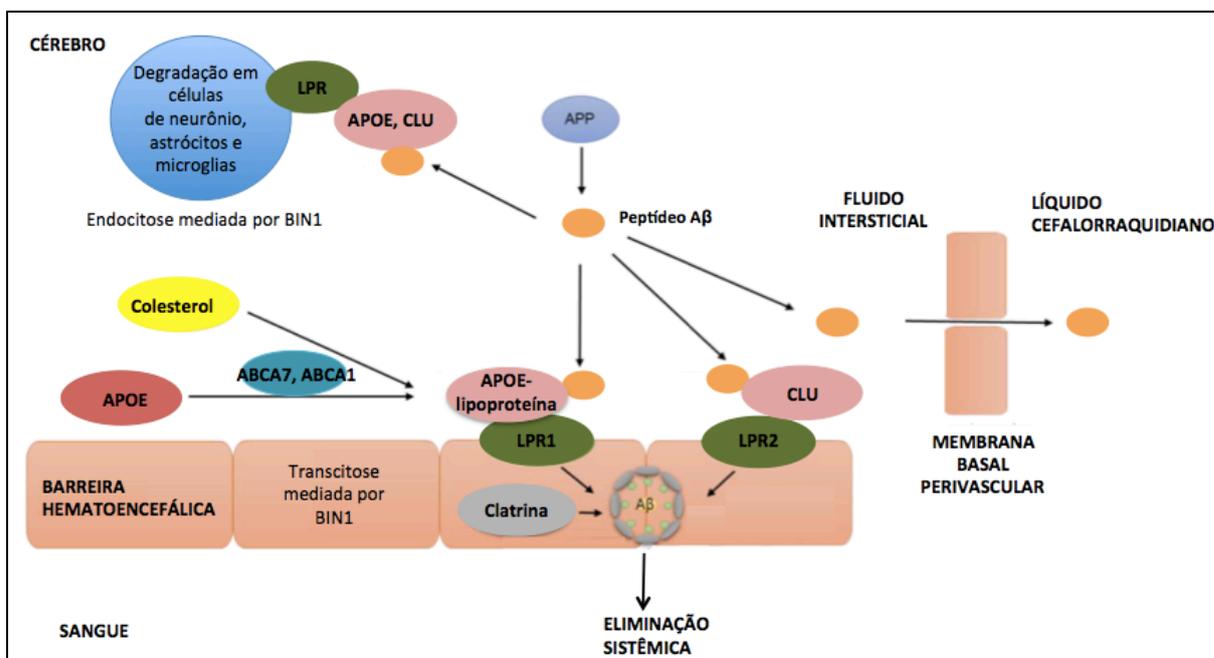


Figura 11: Mecanismos de eliminação de peptídeos A β formados no cérebro (modificado de DONG et al., 2017).

Estudos sugerem que a diminuição da limpeza de peptídeos A β no cérebro é responsável pelo desenvolvimento da DA (DONG et al., 2017; WELLER et al., 2008). E ainda, que a eliminação desses peptídeos está defasada em 30% dos pacientes com Doença de Alzheimer Esporádica (DONG et al., 2017; MAWUENYEGA et al., 2010). Como os genes *APOE*, *ABCA7*, *BIN1* e *CLU*, que são genes que apresentam proteínas atuantes na via, são considerados associados com DAE, estudos de SNPs nesses genes são importantes para se elucidar o papel dos genes na via para a DA.

Várias evidências apoiam a relação entre genes da via do metabolismo, tráfego e endocitose de lipídios com DA. Por exemplo, a isoforma ApoE4 tem menor afinidade com peptídeo A β que, por conseguinte, implica em um funcionamento defasado de limpeza desse peptídeo, evidenciando um papel de risco na DA (LADU et al., 1994). Para o gene *CLU*, estudos demonstraram que sua proteína interage com peptídeos A β *in vitro* e esse complexo foi demonstrado prevenir a agregação e polimerização

desses peptídios, evidenciando um papel neuroprotetor para a DA (MATSUBARA et al., 1996; YU; TAN, 2012). Para o gene *BIN1*, é hipotetizado que SNPs no gene podem impactar sua função na internalização de peptídios A β ₄₂ de forma eficiente para a eliminação dessas moléculas no sistema nervoso, o que o relaciona um papel de risco à DA (DONG et al., 2017; PANT et al., 2009).

2.6.2. Via Inflamatória

A deposição de peptídeos A β no cérebro é o resultado de um desequilíbrio entre a produção e eliminação deste peptídeo. Este desequilíbrio leva ao desenvolvimento de inflamação crônica no cérebro, que é considerada também um *hallmark* patológico para DA (SERPENTE et al., 2014). Isto evidencia que o sistema imune apresenta um papel importante na Doença de Alzheimer (HENEKA et al., 2015; HEPPNER; RANSOHOFF; BECHER, 2015; NIRANJAN, 2013; VILLEGAS-LLERENA et al., 2016).

O processo inflamatório que leva ao desenvolvimento à DA tem como elementos células do sistema imune, principalmente células de micróglia e produtos de reação inflamatória (NIRANJAN, 2013).

As células de micróglia são as principais células do sistema imune inato do sistema nervoso central (ROBERT; WARK, 2012). Elas são considerados macrófagos residentes do cérebro (HENEKA et al., 2015) e podem migrar para regiões afetadas como sentinelas do cérebro. Na presença de patógeno ou partículas de restos celulares, elas são ativadas e liberam fatores do sistema imune para preservar o tecido cerebral (HENEKA et al., 2015; RANSOHOFF; PERRY, 2009). Já em um sistema nervoso não patogênico, as células de micróglia dão suporte e proteção para o crescimento do axônio de neurônios e participam do remodelamento de sinapses (SERPENTE et al., 2014).

Vários elementos podem ativar as células de micróglia (Figura 12). A deposição de placas amilóides e os peptídeos A β , por exemplo, podem contribuir para a ativação de células de micróglia (ROBERT; WARK, 2012). Recentes estudos sugerem

outros mecanismos de ativação das células de micróglia. Sugerem que processos inflamatórios podem induzir à DA independentemente da influência de peptídeos A β (HEPPNER; RANSOHOFF; BECHER, 2015; YU; TAN, 2012). Por exemplo, inflamações locais e sistêmicas, que podem resultar de doenças crônicas como psoríase, obesidade e diabetes tipo 2, além de traumas cerebrais e isquemia (HEPPNER; RANSOHOFF; BECHER, 2015; YU; TAN, 2012).

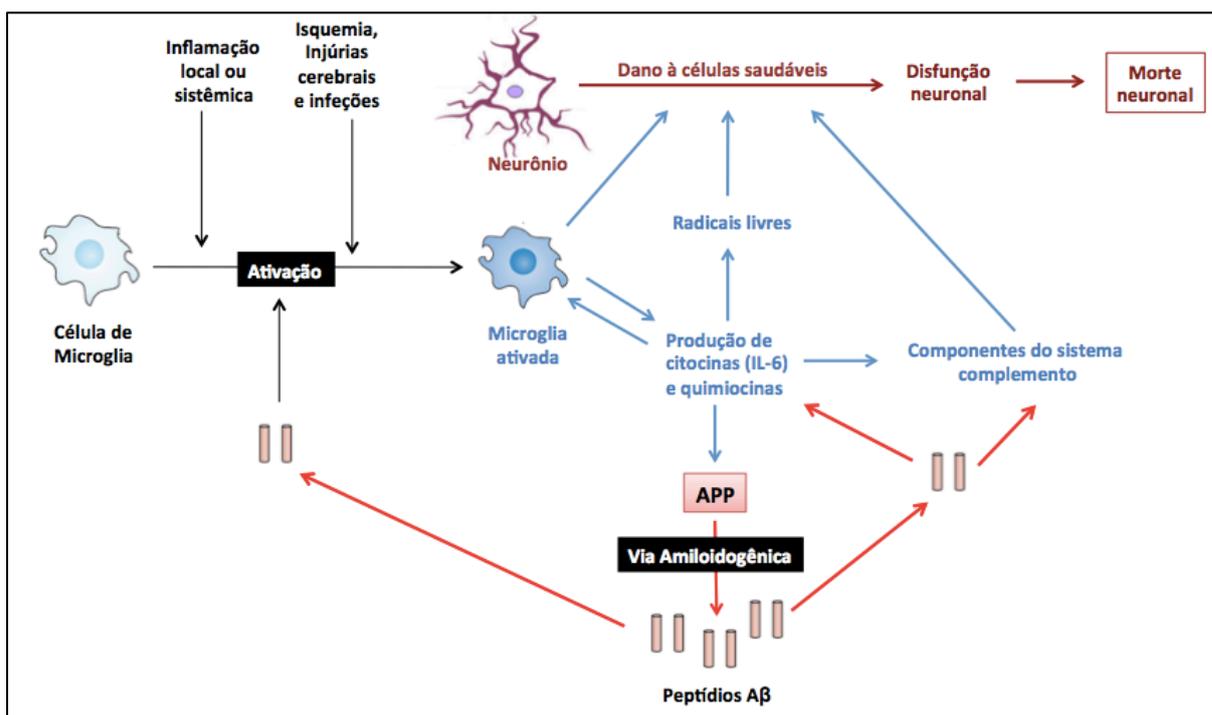


Figura 12: Mecanismos de ativação de células de micróglia em processos inflamatórios. Mecanismos sugeridos com base nos estudos de Heppner, Ransonhoff e Becher (2015), Serpente et al. (2014) e Heneka et al. (2015) (Modificado de HEPPNER; RANSOHOFF; BECHER, 2015; YU; TAN, 2012).

As células de micróglia ativadas podem liberar citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas. Esses elementos podem estimular a produção e o processamento da APP para induzir a formação de peptídeos A β (SERPENTE et al., 2014). As quimiocinas, como os componentes do sistema complemento e espécies reativas de oxigênio, podem levar a disfunção neuronal e eventualmente, morte neuronal (VERRI et al., 2012). Além disso, a ativação das células de micróglia podem também afetar as células saudáveis ao entorno, como neurônios, astrócitos e oligodendrócitos e causar neurodegeneração como perda neuronal (HEPPNER; RANSOHOFF; BECHER, 2015).

Alterações inflamatórias são constantemente observadas em cérebros de pacientes com DA, principalmente em depósitos com peptídeos A β , que apresentam micróglia ativadas. Além disso, estudos sugerem que células de micróglia podem se ligar à peptídeos A β 42 através de receptores em suas membranas e participar na sua eliminação do cérebro (HENEKA et al., 2015; HEPPNER; RANSOHOFF; BECHER, 2015). Esta função de limpeza de peptídeos A β é sugerida estar comprometida na DA (HEPPNER; RANSOHOFF; BECHER, 2015). Conseqüentemente, isso poderia levar ao acúmulo dos peptídeos A β , característico na DA. No entanto, são necessários mais estudos para elucidar melhor esse mecanismo e também a relação das células de microglia e DA.

Além das células de micróglia, as células de neurônios, astrócitos e oligodendrócitos podem contribuir para a neuroinflamação na DA. Os oligodendrócitos, quando ativados, podem expressar componentes do sistema complemento e com isso, contribuir para neuroinflamação, providenciando um aumento do nível de elementos do sistema complemento em cérebros com DA (HOSOKAWA et al., 2003; YAMADA; AKIYAMA; MCGEER, 1990). Os neurônios podem contribuir para os aspectos neuroinflamatórios em DA, uma vez que estudos sugerem que eles tem uma redução na expressão de inibidores de inflamação devido à morte neuronal ou disfunção (HEPPNER; RANSOHOFF; BECHER, 2015). Já os astrócitos, quando recrutadas e ativados por moléculas geradas por depósitos de peptídeos A β , podem expressar várias citocinas e quimiocinas, como IL-6 e TNF- α , por exemplo (LI et al., 2011a; MACCIONI et al., 2009; SERPENTE et al., 2014). Além disso, os astrócitos podem secretar moléculas inflamatórias que aumentam a expressão do mRNA e proteína APP, levando ao aumento a geração de peptídeos A β em DA (LI et al., 2011a; MACCIONI et al., 2009; SERPENTE et al., 2014).

Neste contexto, vários genes são hipotetizados participar da via inflamatória à DA. Por exemplo, as proteínas dos genes *CR1*, *CD33*, *MS4A6A*, *ABCA7* e *CLU* são sugeridos apresentarem participação na eliminação dos peptídeos A β formados no cérebro. Eles são genes expressos em células de micróglia e intitulados como genes de micróglia pelo estudo de Villegas-Llerena et al. (2016). Eles são também genes com variantes reportadas como fatores de risco e proteção para a DAE pelos estudos GWAS (HAROLD et al., 2009; HOLLINGWORTH et al., 2011a; KARCH;

GOATE, 2014; LAMBERT et al., 2009; NAJ et al., 2011). Esses resultados reforçam ainda mais o conceito de que células de microglias podem apresentar suas funções alteradas na DA (HEPPNER; RANSOHOFF; BECHER, 2015).

Além dos genes reportados por GWAS, outros genes também são constantemente relacionados ao papel na via inflamatória da DA, como por exemplo, o *IL-6*. Como uma citocina, a proteína deste gene pode ser secretado por micróglias e astrócitos induzidos por peptídeo A β (CAPURSO, 2011). Além disso, níveis aumentos de IL-6 foram encontrados em cérebros de pacientes com DA (MCGEER; MCGEER, 1997).

Várias evidências apoiam a relação desses genes na via inflamatória à DA. Em relação ao gene *CD33*, o estudo de Griciuc et al. (2014) encontrou que as células de micróglias que expressaram a proteína CD33 com deleção do exon 2, que apresenta ligante para ácido siálico, tiveram abolição da inibição do englobamento do peptídeo A β_{42} . Como o domínio responsável pelo ácido siálico em CD33 pode inibir a fagocitose de placas amilóides, que se apresentam ligadas à ácido siálico (SALMINEN; KAARNIRANTA, 2009), estes resultados sugerem uma interação entre CD33 sem exon 2 com a ligação com peptídeo A β_{42} na DA. Para o gene *MS4A6A*, o estudo de Karch et al. (2012) reportou uma correlação positiva da expressão da proteína MS4A6A com marcadores de micróglia AIF-1. Já sobre o gene *ABCA7*, sua proteína é predominantemente expressa em células de microglia. Estudos sugerem que o ABCA7 pode regular o risco à DA via a função de eliminação de peptídios A β_{42} de células de microglias (KIM et al., 2013).

O estudo *in vitro* de Rogers et al. (1992) mostrou que peptídios A β_{42} podem ativar o sistema complemento em amostras de cérebro com DA. Além disso, estudos sugerem que os genes *CR1* e *CLU* podem atuar na regulação do sistema complemento (ROGERS et al., 2006). Apesar da proteína Clusterina do gene *CLU* ser mais expressa em células de astrócitos e oligodendrócitos do que em micróglias (ZHANG et al., 2014), estudos sugerem um papel em células de microglia. E ainda, sugerem que Clusterina pode modular o complexo de ataque à membrana para inibir a resposta inflamatória associada a ativação do sistema complemento (JONES; JOMARY, 2002), evidenciando um papel neuroprotetor à DA (KIRSZBAUM; BOZAS; WALKER, 1992; SHEN; MERI, 2003).

2.7. Estudo de Epistasia na Doença de Alzheimer

O estudo de epistasia envolve a interação de vários genes contribuindo para um único fenótipo (EBBERT; RIDGE; KAUWE, 2015). Pode ser classificada em epistasia estatística e biológica. A epistasia estatística analisa derivação de efeitos aditivos entre fatores em um modelo (EBBERT; RIDGE; KAUWE, 2015; MOORE; WILLIAMS, 2005) enquanto que a biológica é a interação física entre dois ou mais componentes biológicos (EBBERT; RIDGE; KAUWE, 2015), como estudos funcionais entre duas proteínas por exemplo.

De acordo com o estudo de Ebbert, Ridge e Kauwe (2015), ambos tipos de epistasia apresentam pontos positivos e negativos. A epistasia biológica pode fornecer informações cruciais sobre a doença em estudo, como o papel de atuação da proteína investigada na doença (EBBERT; RIDGE; KAUWE, 2015). No entanto, os experimentos para descobrir a interação física são em geral muito custosos e podem ser limitantes a alguns candidatos de interações (EBBERT; RIDGE; KAUWE, 2015). Já a epistasia estatística se baseia em variantes genéticas ao invés de moléculas biológicas e por conseguinte, a associação encontrada não dá evidência de que as moléculas biológicas correspondentes de fato interajam fisicamente (EBBERT; RIDGE; KAUWE, 2015). Além disso, pode resultar em falso-positivos e falso-negativo (EBBERT; RIDGE; KAUWE, 2015). No entanto, a epistasia estatística é muito importante pois pode providenciar a descoberta de uma nova associação entre a interação de duas moléculas biológicas que não haviam sido exploradas ou descobertas no estudo de epistasia biológica (EBBERT; RIDGE; KAUWE, 2015). Com isso, pode abrir precedentes para investigar o estudo dessa interação biologicamente (EBBERT; RIDGE; KAUWE, 2015).

Para o estudo de epistasia estatística, várias análises estatísticas podem ser usadas, como por exemplo a regressão logística e fator de sinergia (*synergy factor*), que são os melhores modelos para examinar interações binárias (MOORE; WILLIAMS, 2005). A regressão logística é a mais utilizada para interações binárias devido ao pequeno número amostral (COMBARROS et al., 2009b). O fator de sinergia (*synergy factor*) recentemente tem sido usado por pesquisadores. Ele

relaciona o *odds ratio* do valor esperado com o esperado para uma dada interação e necessita de um número amostral grande para realizar uma análise estatística confiável (COMBARROS et al., 2009b; CORTINA-BORJA et al., 2009; EBBERT; RIDGE; KAUWE, 2015).

O estudo de epistasia estatística na Doença de Alzheimer não é muito explorado mas apresenta grandes evidências que pode apresentar um papel na doença (COMBARROS et al., 2009a). Por exemplo, a maioria dos SNPs reportados por estudos de GWAS apresentam pequeno efeito de risco para DA (EBBERT; RIDGE; KAUWE, 2015). Além disso, a maioria dos estudos de associação replicaram os efeitos desses SNPs individualmente (EBBERT; RIDGE; KAUWE, 2015) e nem todos os estudos alcançaram significância estatística (CASCORBI et al., 2013; KLIMKOWICZ-MROWIEC et al., 2013; LI et al., 2011b; OHARA et al., 2012; OMOUMI et al., 2014). A não significância pode ser um sinal de interação de epistasia. Isto porque essas variantes talvez possam modular o risco ou proteção à DA em conjunto com outras variantes (COMBARROS et al., 2009a).

Assim, o estudo de interação de epistasia é importante pois pode ajudar a elucidar doenças complexas como DA. Isto porque tem como objetivo descobrir interações críticas que podem ter implicações em papéis funcionais na DA (COMBARROS et al., 2009b; XIONG et al., 2005).

2.8. Biomarcadores da Doença de Alzheimer

Na Doença de Alzheimer, os eventos fisiopatológicos precedem anos antes do aparecimento dos sintomas clínicos da doença (JACK et al., 2010, apud CAIXETA, 2012). Por exemplo, os peptídeos A β , que são formados pelo processamento da proteína APP, podem surgir mais precocemente, em pequenos agregados ou não, 10 anos antes do surgimento dos primeiros sintomas de DA (FROTA et al., 2011). Com isso, as pesquisas estão em busca de uma forma de identificar traços da doença na fase de DA pré-clínica dos pacientes antes do seu estabelecimento por completo. Para isso, uma das formas estudadas atualmente é a utilização biomarcadores.

De acordo com o grupo *National Institute of Health Director's Initiative on Biomarkers and Surrogate Endpoint*, os biomarcadores podem ser definidos como "[...] uma característica que pode ser medida e avaliada como um indicador de um processo biológico normal, processo patogênico ou de resposta farmacológica a uma intervenção terapêutica (ATKINSON A.J. et al., 2001, tradução nossa)". Eles podem ser usados como ferramentas para auxiliar no diagnóstico, monitoramento do desenvolvimento ou extensão de uma doença, prognóstico e também como forma de prever ou monitorar uma resposta clínica de uma intervenção medicamentosa (ATKINSON A.J. et al., 2001).

Na Doença de Alzheimer há o estudo de biomarcadores bioquímicos e de neuroimagem (CAVEDO et al., 2014). Os biomarcadores bioquímicos estudados são o nível da proteína Tau e de peptídeos A β no líquido cefalorraquidiano. Eles são considerados os biomarcadores bioquímicos mais promissores para DA (AGRAWAL; BISWAS, 2015). O nível da proteína Tau averiguado é o nível total expresso e o nível da proteína no seu estado fosforilado e ambos estados da proteínas são correlacionados com a concentração de emaranhados de neurofibrilas em pacientes com DA (EWERS et al., 2007). No entanto, enquanto alguns estudos encontraram que os níveis da proteína total e fosforilada estão aumentas em pacientes com Alzheimer em comparação aos controles (BUERGER et al., 2006), outros estudos não encontraram essa correlação (BUERGER et al., 2007; ENGELBORGHIS et al., 2007). Isto evidencia a necessidade de mais estudos para elucidar a correlação entre nível da proteína Tau mensurada e DA. Já o estudo com o nível de peptídeos A β_{1-42} apresentam resultados menos conflitantes. O conceito estudado é de que deposição de peptídios A β pode levar a redução de peptídeos A β solúveis circulantes no cérebro e no líquido cefalorraquidiano (EWERS et al., 2007). Assim, os níveis de peptídeos A β_{42} mensurados estão diminuídos em pacientes com Alzheimer em comparação aos controles (EWERS et al., 2007).

Os biomarcadores de neuroimagem são utilizados para mensuração e detecção de neurodegeneração (CAVEDO et al., 2014). Há diversos tipos, como IRM (Imagem por Ressonância Magnética) de forma estrutural e funcional e o PET (*Positron Emission Tomography*) (REITZ; MAYEUX, 2014). O IRM estrutural é utilizado para

identificar atrofia cerebral em pacientes com DA em regiões específicas do cérebro, como por exemplo no hipocampo (BARKHOF et al., 2011). Atrofia no hipocampo pode sugerir declínio na função e progressão de memória, além de risco para DA (APOSTOLOVA et al., 2006; MUNGAS et al., 2005). Já o IRM funcional visualiza as atividades neuronais durante o repouso e atividade específica em regiões do cérebro. A forma mais comum é o método *BOLD-fMRI* (*Blood-Oxygenation Level Dependent - functional Magnetic Resonance Imaging*) (BARKHOF et al., 2011). Este método mede as alterações na corrente sanguínea cerebral e segue a premissa de que o neurônio em atividade aumenta a demanda por hemoglobina com oxigênio e esse aumento é medido como sinal *BOLD* (CELONE et al., 2006). Estudos mostraram uma diminuição no sinal *BOLD* em regiões específicas do cérebro de pacientes com DA, como no hipocampo, comparado com os controles (SPERLING, 2011).

O PET é um exame que produz imagens tridimensionais ou funcionais de processos do organismo (TORRES et al., 2012). Ele apresenta atualmente dois tipos: o PIB-PET e o FDG-PET. O PIB ou *Pittsburgh compound B* é uma molécula marcada com um isótopo radioativo do carbono (^{11}C) que se liga seletivamente em placas amilóides (REITZ; MAYEUX, 2014). Este teste demonstrou que há uma grande quantidade de peptídeos A β em cérebros de indivíduos antes do início de DA ou mesmo antes de um declínio cognitivo (LISTA et al., 2015). Já o FDG ou *Fluorodeoxyglucose* é um composto análogo da glicose utilizado para mensurar o metabolismo cerebral da glicose. Em DA, há uma menor captação de glicose pelas células cerebrais (TORRES et al., 2012). Neste teste, valores diminuídos de FDG sugerem um parâmetro de função sináptica enfraquecida na DA (LISTA et al., 2015).

Até o momento, os biomarcadores bioquímicos e os de neuroimagem são os biomarcadores mais estudados em DA (LUTZ et al., 2016). No entanto, estes biomarcadores são considerados invasivos. Os biomarcadores no líquido cefalorraquidiano, por exemplo, necessitam de realizar punção lombar. Além disso, apresentam problemas com a falta de padronização entre laboratórios e também de referência padrão dos valores mensurados (LUTZ et al., 2016). Já os biomarcadores de neuroimagem apresentam outras problemáticas, como, por exemplo, requerem equipamentos especializados que são custosos e que geralmente se encontram em

centros médicos específicos (LUTZ et al., 2016; REMBACH, 2014). Também necessitam de uma equipe treinada e especializada para administrar os testes e os interpretar (LUTZ et al., 2016; REMBACH, 2014).

Atualmente, estudos sugerem que os microRNAs estão diretamente associados com DA. Os microRNAs são pequenas fitas não codificantes de RNA que podem regular a expressão gênica (BHATTACHARJEE; ZHAO; LUKIW, 2014). Por exemplo, foi reportado que o microRNA 153 pode inibir a expressão da proteína APP enquanto que baixas dosagens desse microRNA pode levar ao aumento da expressão de APP em pacientes com DA (LONG; RAY; LAHIRI, 2012). A desregulação de um perfil de biomarcadores de microRNAs é investigado como um mecanismo patogênico para DA (KONG et al., 2014). Com isso, microRNAs circulantes no soro estão sob estudo para biomarcadores de DA (GALIMBERTI et al., 2014).

O uso de microRNAs como biomarcadores apresentam alguns entraves. Por exemplo, não se tem uma padronização para a metodologia empregada nos experimentos bem como análise dos resultados (ZAFARI et al., 2015). Além disso, sabe-se que diferentes doenças podem apresentar fatores de risco similares, como doenças cardiovasculares e diabetes (BEERI et al., 2009; MCCLEAN et al., 2011), o que pode repercutir em perfis de microRNA semelhantes (ZAFARI et al., 2015). E ainda, apesar dos estudos almejarem utilizar soro e sangue periférico no estudo com microRNAs, o líquido cefalorraquidiano ainda é considerado mais apropriado para microRNAs uma vez que apresenta relação direta com o tecido cerebral para monitorar as mudanças neurofisiológicas da DA (DENK et al., 2015).

O grande desafio na pesquisa atualmente é a utilização de biomarcadores mais acessíveis e menos invasivos de fluidos corporais, como sangue, soro e plasma (LISTA et al., 2015; ZAFARI et al., 2015). Nesse aspecto, o estudo de Ma e Lam (2011) sugere a criação de um painel de variantes genéticas para a DA. De acordo com o estudo, os SNPs reportados por GWAS, contribuem com pequeno efeito para a doença e é improvável que um SNP apenas possa ser suficiente como um biomarcador confiável para DA. Com isso, a ideia sugerida por Ma e Lam (2011) é utilizar vários SNPs como biomarcadores.

A criação de um painel ou perfil variantes genéticas para DAE, que é a forma genética que acomete 98% dos casos de DA (YU; TAN; HARDY, 2014), poderia auxiliar no diagnóstico precoce da doença, principalmente em pacientes na fase de DA pré-clínica. Isto porque tratar pacientes nessa fase poderia atrasar o início da doença ou reduzir o risco para DA (LANGBAUM et al., 2013). A grande vantagem desse painel seria o uso de um método pouco invasivo, uma vez que se utilizaria sangue de pacientes para realizar a genotipagem de SNPs.

O painel poderia ser composto por SNPs que foram relatados associados com DAE por estudos GWAS, como por exemplo, rs3764650 em *ABCA7*, rs744373 em *BIN1*, rs6656401 em *CR1*, rs429358 e rs7412 em *APOE*, rs610932 em *MS4A6A*, rs3865444 em *CD33* e rs1136000 em *CLU*. Além desses SNPs, variantes não reportadas em GWAS mas constantemente estudadas também deveriam ser estudadas no painel, como o polimorfismo rs1800795 no gene *IL-6*. Como variantes de risco podem variar de população para população devido ao perfil genético é interessante se realizar um painel específico para cada população. E ainda, para a criação de um painel de biomarcadores de variantes genéticas, a partir de um grupo selecionado de variantes, é essencial averiguar primeiro se as variantes genéticas para uma dada população apresentam risco ou proteção para DAE isoladamente. Por conseguinte, analisar se variantes modulam o risco em epistasia com outras variantes de uma mesma via à DA.

Atualmente, estudos sugerem que o método mais efetivo no estabelecimento de um diagnóstico para a DA é a análise multimodal no qual são utilizados as avaliações clínicas e resultados dos exames de biomarcadores bioquímicos e de neuroimagem em conjunto (LISTA et al., 2015). Com isso, a criação de um painel de biomarcadores de variantes genéticas poderia ser utilizado de forma não isolada mas em conjunto com outros biomarcadores de forma multimodal para melhorar a precisão no estabelecimento do diagnóstico para a Doença de Alzheimer.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo identificar um possível perfil de biomarcadores genéticos para a Doença de Alzheimer Esporádica com os SNPs nos genes *ABCA7* (rs3764650), *MS4A6A* (rs610932), *CD33* (rs3865444), *CR1* (rs6656401), *BIN1* (rs744373), *IL-6* (rs1800795), *CLU* (rs1136000) e *APOE* (rs429358 e rs7412) em uma amostra de pacientes na população da Grande Vitória-ES.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Caracterizar a amostra de pacientes com Doença de Alzheimer Esporádica e controles não demenciados quanto à dados demográficos e clínicos;
- Estimar a frequência genotípica e alélica nos SNPs dos genes *ABCA7* (rs3764650), *MS4A6A* (rs610932), *CD33* (rs3865444), *CR1* (rs6656401), *BIN1* (rs744373) e *IL-6* (rs1800795) em pacientes e controles;
- Investigar a associação dos SNPs nos genes *ABCA7* (rs3764650), *MS4A6A* (rs610932), *CD33* (rs3865444), *CR1* (rs6656401), *BIN1* (rs744373) e *IL-6* (rs1800795) com a Doença de Alzheimer Esporádica na população da Grande Vitória-ES;
- Verificar a associação dos SNPs nos genes *ABCA7* (rs3764650), *MS4A6A* (rs610932), *CD33* (rs3865444), *CR1* (rs6656401), *BIN1* (rs744373) e *IL-6* (rs1800795) em portadores do alelo $\epsilon 4$ para o gene *APOE* (rs429358 e rs7412) com a Doença de Alzheimer Esporádica na população da Grande Vitória-ES;
- Averiguar a associação de epistasia entre os SNPs da via inflamatória

(rs3764650 *ABCA7*, rs610932 *MS4A6A*, rs3865444 *CD33*, rs6656401 *CR1*, rs1800795 *IL-6* e rs1136000 *CLU*) e da via do metabolismo, tráfego e endocitose de lipídios (rs744373 *BIN1*, rs429358 e rs7412 *APOE*, rs3764650 *ABCA7* e rs1136000 *CLU*) para Doença de Alzheimer Esporádica.

4. METODOLOGIA

4.1. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos, da Escola Superior de Ciências da Saúde de Vitória – EMESCAM. Os participantes do estudo ou representantes legais assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido para participar do estudo.

4.2. AMOSTRA

No presente estudo, a amostra apresenta 241 indivíduos não consanguíneos, incluindo 159 controles pareados em relação à idade e sexo e 82 pacientes com diagnóstico de Doença de Alzheimer Esporádica.

Os voluntários, incluindo controles e pacientes, foram tratados e diagnosticados pelo geriatra colaborador da pesquisa Dr. Renato Lírio Morelato na unidade Geriátrica do Hospital Santa Casa de Misericórdia de Vitória (HSCMV) e Centro de Referência de Atendimento ao Idoso (CRAI).

Os pacientes selecionados foram clinicamente diagnosticados para Doença de Alzheimer provável de acordo com os critérios de *NINCDS-ADRDA* (MCKHANN et al., 1984). Para isso, os pacientes passaram por uma avaliação completa para diagnóstico de demência, incluindo tomografia computadorizada do crânio, testes bioquímicos realizados na época do diagnóstico e repetidos dois anos depois, como hemograma completo, TSH, eletrólitos séricos, vitamina B12, ácido fólico, uréia, glicose sérica e sorologia da sífilis e HIV (CAMPOREZ, 2014). Todos estes testes mencionados são necessários para descartar outras causas, que não sejam Doença de Alzheimer, para o desenvolvimento de demência, como o hipotireoidismo, infecção por HIV, sífilis, deficiência de ácido fólico, vitamina B12 e B3 (CASTELLANI; ROLSTON; SMITH, 2011). Os pacientes também passaram por métodos padrões de exame, como o histórico médico, que é importante para estabelecer um histórico de

detrimento progressivo da Doença de Alzheimer. Outro parâmetro utilizado foram aplicações de exames clínicos, psiquiátricos e neurológicos para: a) descartar outras doenças cerebrais e sistêmicas que possam contar como declínio cognitivo progressivo, como Doença de Parkinson, tumor cerebral, acidente vascular cerebral e Coreia de Huntington; b) descartar outras causas de demência, como demência vascular, demência frontotemporal, demência com Corpos de Lewy, demência com Doença de Parkinson e demências reversíveis (CASTELLANI; ROLSTON; SMITH, 2011). Também foram realizados testes para avaliar nível de cognição como o *MMSE* (FOLSTEIN; FOLSTEIN; MCHUGH, 1975). Os pacientes da pesquisa tiveram escore de 14-4 para o *MMSE*. Os pacientes selecionados também não tinham parentes com Doença de Alzheimer e apresentavam idade e início de sintomas de demência acima de 65 anos para não haver casos de Doença de Alzheimer Familiar na amostra de pacientes.

Os controles selecionados estavam dentro dos critérios para participar como controle, como: a) níveis cognitivos considerados não deficientes comprovados pelo teste *MMSE*, com escore maior que 28 e b) ausência de parentes com Doença de Alzheimer. A idade selecionada foi acima de 65 anos para parear com os pacientes neste estudo de caso-controle.

4.3. COLETA DE SANGUE

A coleta de sangue foi realizada na unidade geriátrica do HSCMV pelos pesquisadores do laboratório Núcleo de Genética Humana e Molecular (NGHM) da UFES. Coletou-se 5ml de sangue periférico em tubo com 5% de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). O DNA genômico foi extraído seguindo recomendações da metodologia de Miller, Dykes e Polesky (1988). As concentrações e purezas das amostras foram medidas usando NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific).

4.4. DADOS DEMOGRÁFICOS

Dados referentes a gênero, idade, etnia e escolaridade dos pacientes e controles foram anotados durante a coleta de sangue no hospital pelos pesquisadores.

4.5. GENOTIPAGEM

A identificação dos genótipos e alelos dos polimorfismos na amostra foi feita por dois métodos:

- PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism*) para os genes *IL-6* (rs1800795), *BIN1* (rs744373) e *CD33* (rs3865444);
- qPCR (*Real-Time Polymerase Chain Reaction*) para os genes *CR1* (rs6656401), *ABCA7* (rs3764650) e *MS4A6A* (rs610932).

Os SNPs nos genes *ABCA7*, *MS4A6A* e *CR1* foram amplificados por PCR convencional e verificados por check-gel para posteriormente validar por sequenciamento de Sanger os genótipos encontrados.

Os SNPs nos genes *CLU* e *APOE* foram genotipados anteriormente pelos pesquisadores Luciano Belcavello e Bruno Vinícius Pimenta de Almada, respectivamente, no Núcleo de Genética Humana e Molecular. A genotipagem foi através de PCR-RFLP usando protocolos descritos para *CLU* (BELCAVELLO et al., 2015) e *APOE* (ALMADA et al., 2012).

A genotipagem dos polimorfismos nos genes *IL-6*, *BIN1* e *CD33* foram realizados no laboratório Núcleo de Genética Humana e Molecular - NGHM, UFES, ES. Os procedimentos práticos nos genes *MS4A6A* e *CR1* foram realizados no Instituto de Biociências, USP, São Paulo, coordenado pela professora Dra. Maria Rita dos Santos e Passos-Bueno. Já os procedimentos para o gene *ABCA7* foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio na UFES, ES, coordenado pela professora Dra. Patricia Machado Bueno Fernandes.

4.5.1. Genotipagem dos genes *IL-6*, *BIN1* e *CD33*

O estudo dos polimorfismos nos genes *IL-6* (rs1800795), *BIN1* (rs744373) e *CD33* (rs3865444) foram realizados através da PCR-RFLP. Para a PCR do gene *IL-6*, foi utilizado os *primers* baseados no estudo de Olomolaiye, Wood e Bidwell (1998). Os SNPs nos genes *BIN1* e *CD33* tiveram seus *primers* desenhados. Para isso, a sequência de nucleotídeos foi acessada no banco de dados do site *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (WHEELER et al., 2004) para selecionar a sequência referente aos SNPs em *BIN1* (NT 005079.9) e *CD33* (NT 011109). Para o gene *CD33*, desenhou-se a sequência dos *primers Forward* e *Reverse* da fita senso usando a ferramenta do site Primer3 v. 0.4.0 (ROZEN; SKALETSKY, 2000). Para o gene *BIN1*, elaborou-se a sequência do primer *Forward* da fita senso usando a ferramenta do site Primer3 v. 0.4.0. e para a sequência do primer *Reverse*, foi usada ferramenta do site *dCAPS Finder 2.0*. (NEFF; TURK; KALISHMAN, 2002). O primer *Forward* é degenerado no nucleotídeo A localizado no final do primer. A sequência dos *primers* dos genes *IL-6*, *BIN1* e *CD33*, estão apresentados na Tabela 3.

A PCR convencional para os SNPs nos genes *IL-6*, *BIN1* e *CD33* foi realizada no termociclador Veriti® 96 (Applied Biosystems) seguindo padronizações feitas para concentrações específicas dos reagentes de PCR e das reações, descritas respectivamente nas Tabelas 4 e 5. Os produtos de PCR foram visualizados em corrida de eletroforese utilizando gel de poliacrilamida à 7% corado com nitrato de prata. As corridas eletroforéticas seguiram as padronizações descritas na Tabela 6.

Tabela 3: Sequência dos *primers* utilizados nas reações de PCR.

SNP	Sequência do Primer
<i>IL-6</i> (rs1800795)	F = TTGTCAAGACATGCCAAGTGCT R=GCCTCAGAGACATCTCCAGTCC
<i>BIN1</i> (rs744373)	F=CACCAGGGACAGGCAGGTCTGAG <u>A</u> C R= CACATCTTAGCCACAGAACAGG
<i>CD33</i> (rs3865444)	F= TCCTTCCACTCTGAGGTGCT R= TTTGTTTCTCTGCCCCAGAC

F= Sequência *Forward* 5'-3', R= Sequência *Reverse* 5'-3' , A= nucleotídeo degenerado.

Tabela 4: Padronização dos reagentes para a reação da PCR.

Reagentes	Concentração Inicial	Concentração Final	<i>BIN1</i>	<i>CD33 e IL-6,</i>
			Volume (µl)	Volume (µl)
PCR Buffer	10X	1X	1,00	2,00
MgCl ₂	50mM	1,5mM	0,30	0,60
dNTP	10mM	0,2mM	0,20	0,40
Primer Forward	10mM	0,5mM	0,50	1,00
Primer Reverse	10mM	0,5mM	0,50	1,00
Taq DNA Polymerase	5U/µL	0,05U/µL	0,10	0,20
DNA	-	40ng/µL	1,00	1,00
Água Ultrapura	-	-	6,4	13,80
Total	-	-	10,0	20,00

Tabela 5: Padronização da reação de PCR para os genes em estudo.

SNPs	Etapas	Desnaturação		Hibridação	Extensão	Extensão Final
		1	2			
<i>IL-6</i> (rs1800795)	N° de ciclos	1	28	28	28	1
	Temperatura	94°C	94°C	62°C	72°C	72°C
	Tempo	4min.	30seg.	30seg.	30seg.	10min.
<i>BIN1</i> (rs744373)	N° de ciclos	1	32	32	32	1
	Temperatura	94°C	94°C	72°C	72°C	72°C
	Tempo	4min	30seg.	30seg.	30seg.	10min.
<i>CD33</i> (rs3865444)	N° de ciclos	1	35	35	35	1
	Temperatura	94°C	94°C	62°C	72°C	72°C
	Tempo	5min	30seg.	30seg.	30seg.	10min.

Tabela 6: Padronização da Eletroforese em Gel para os genes em estudo.

SNPs	Voltagem	Corrente	Potência	Tempo
<i>IL-6</i> (rs1800795)	200V	300mA	100W	2h15
<i>BIN1</i> (rs744373)	200V	300mA	100W	1h50
<i>CD33</i> (rs3865444)	180V	300mA	100W	1h30

Para a digestão do produto de PCR no gene *IL-6*, foi utilizado a enzima de restrição *NlaIII* (New England Biolabs) baseado no estudo de Olomolaiye, Wood e Bidwell (1998). O gene *CD33* teve a enzima de restrição *NcoI* (Ludwig Biotecnologia) selecionada utilizando a ferramenta do site NEBcutter (VINCZE; POSFAI; ROBERTS, 2003). Para o *BIN1*, a enzima de restrição selecionada foi a *Hinfl* (New

England Biolabs), através da ferramenta do site *dCAPS Finder 2.0* (NEFF; TURK; KALISHMAN, 2002).

Para realizar a digestão com enzimas de restrição, 5µL do produto de PCR dos SNPs em *BIN1* e *CD33* e 10µL para o SNP no gene *IL-6* foram digeridos com as enzimas *Hinfl*, *NcoI* e *NlaIII*, respectivamente, à 37°C *overnight* seguindo as padronizações dos reagentes para digestão descritos na Tabela 7. Após a digestão, os produtos foram analisados por eletroforese em géis de poliacrilamida a 7% corados com nitrado de prata seguindo o mesmo protocolo usado na eletroforese de produtos de PCR (Tabela 6). Os fragmentos a serem gerados pelas enzimas *Hinfl*, *NcoI* e *NlaIII* na digestão estão especificados na Tabela 8.

Tabela 7: Padronização da Digestão do produto de PCR para os genes *IL-6*, *BIN1* e *CD33*.

SNPs	Reagentes	Concentração Inicial	Concentração Final	Volume (µl)
<i>IL-6</i> (rs1800795)	Produto de PCR	-	-	10,00
	Água Ultrapura	-	-	7,60
	<i>NEBuffer 4</i>	10X	1X	2,00
	BSA	100X	1X	0,20
	Enzima <i>NlaIII</i>	10U/ml	1U/ml	0,20
	Total	-	-	20,00
<i>BIN1</i> (rs744373)	Produto de PCR	-	-	5,00
	Água Ultrapura	-	-	3,90
	<i>NEBuffer 4</i>	10X	1X	1,00
	Enzima <i>Hinfl</i>	10U/ml	1U/ml	0,10
	Total	-	-	10,00
<i>CD33</i> (rs3865444)	Produto de PCR	-	-	5,0
	Água Ultrapura	-	-	3,9
	<i>CutSmart Buffer</i>	10X	1X	1,0
	Enzima <i>NcoI</i>	10U/ml	1U/ml	0,1
	Total	-	-	10,00

Tabela 8: Tamanho de fragmento gerado por digestão para os genes *IL-6*, *BIN1* e *CD33*.

SNPs	Alelos	Enzima de restrição	Fragmentos gerados pela digestão		
			Genótipo Homozigoto Ancestral	Genótipo Heterozigoto	Genótipo Homozigoto Mutante
<i>IL-6</i> (rs1800795)	G e C	<i>NlaIII</i>	246pb e 59pb - GG	246pb, 135pb, 111pb e 59pb - GC	135pb, 111pb e 59pb - CC
<i>BIN1</i> (rs744373)	T e C	<i>Hinfl</i>	226pb e 24pb - TT	250pb, 226pb e 24pb - TC	250pb - CC
<i>CD33</i> (rs3865444)	G e T	<i>NcoI</i>	96pb e 68pb - GG	164pb, 96pb e 68pb - GT	164pb - TT

4.5.2. Genotipagem dos genes *ABCA7*, *MS4A6A* e *CR1*

O estudo dos polimorfismos nos genes *ABCA7* (rs3764650), *MS4A6A* (rs610932) e *CR1* (rs6656401) foram realizados através da qPCR.

Para realizar a qPCR, foram selecionados ensaios TaqMan® SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems) específicos para cada SNP de acordo com os ensaios disponibilizados pela Applied Biosystems (Tabela 9) e um kit de TaqMan® Genotyping Master Mix (Applied Biosystems). Cada ensaio TaqMan® SNP Genotyping Assay apresenta um par de *primers* específicos para amplificar a sequência de interesse e duas sondas TaqMan®, sendo uma sonda com fluoróforo VIC® para detectar sequência de DNA com Alelo 1 e uma sonda com fluoróforo FAM® específico para sequência do Alelo 2 do SNP específico. As sondas TaqMan® apresentam um quencher não fluorescente (non-fluorescence quencher - NFQ) em cada sonda. Cada kit do Master MIX apresenta uma AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, *Deoxyribonucleotide triphosphates* (dNTPs), um fluoróforo ROX™ de referência passiva e componentes de Buffer (TECHNOLOGIES, 2014).

Foram utilizadas placas Fast de 96 poços *TaqMan® Plates* (Applied Biosystems) para as reações de qPCR. As concentrações padronizadas dos reagentes bem como as reações padronizadas pela *Applied Biosystems* podem ser vistas nas Tabelas 10 e 11, respectivamente. As reações foram realizadas no termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

A determinação de genótipos e alelos de cada amostra foi analisada pelo software SDS v.2.0.5 (Applied Biosystems) fornecido junto com o termociclador pela *Applied Biosystems*. O genótipo foi estabelecido através da fluorescência do fluoróforo correspondente especificamente ao alelo 1 e 2 para cada SNP. O *threshold*, nível de fluorescência para amplificação, foi estabelecido para cada SNP e usado para todas as amostras, baseando-se no nível de fluorescência de amostras controles positivas. Essas amostras controles eram positivas para genótipos homozigotos e heterozigotos de cada SNP, confirmadas previamente por sequenciamento de Sanger. A amostra que apresentava genótipo homozigoto para Alelo 1 teve emissão de fluorescência de VIC®; para genótipo homozigoto para Alelo 2 teve emissão de fluorescência de FAM® e para genótipo heterozigoto, tiveram fluorescências de VIC® e FAM® (TECHNOLOGIES, 2014). Informações sobre a identificação genotípica e alélica para cada SNP, bem como valor de fluorescência de *threshold* é mostrado na Tabela 12. A análise dos genótipos de cada amostra foram observados em gráficos ΔRn x ciclos, gerados pelo programa. O ΔRn é a magnitude do sinal gerado na reação e é determinado pela fórmula $(Rn+) - (Rn-)$. O Rn é a intensidade de emissão de fluorescência do corante reporter (VIC® ou FAM®) dividido pela intensidade de emissão do corante passivo de referência (ROX™). O $Rn+$ é o valor de Rn de uma reação contendo todos os componentes, incluindo o DNA. O $Rn-$ é o valor de Rn de uma reação sem o DNA (TECHNOLOGIES, 2014).

Tabela 9: Identificação dos ensaios *TaqMan*® para os genes *ABCA7*, *MS4A6A* e *CR1*.

SNP	Identidade do Ensaio	Alelo		Corante do Fluoróforo		Quencher do Fluoróforo	
		1	2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
ABCA7 (rs3764650)	C 27478162 10	G	T	VIC®	FAM®	NFQ	NFQ
MS4A6A (rs610932)	C 27161626 10	G	T	VIC®	FAM®	NFQ	NFQ
CR1 (rs6656401)	C 30033241 10	A	G	VIC®	FAM®	NFQ	NFQ

NFQ= *non-fluorescent quencher*;

Tabela 10: Padronização dos reagentes para a reação da qPCR.

Reagentes	Concentração Inicial	Concentração Final	Volume (μ l)
Água Ultrapura	-	-	6,125
<i>TaqMan</i> ® Genotyping Master Mix	4000X	3X	7,5
<i>TaqMan</i> ® SNP Genotyping Assay	40X	0.024X	0,375
DNA	-	30ng/ μ l	1,00
Total	-	-	15,00

Tabela 11: Reação de qPCR padronizada para os genes *ABCA7*, *MS4A6A* e *CR1*.

Etapas	Pré-Hold	Desnaturação Inicial	Desnaturação	Hibridação e Extensão	
N° de ciclos	1	1	40	40	1
Temperatura	60°C	95°C	95°C	60°C	60°C
Tempo	1 min.	10 min.	15 seg.	1 min.	1 min.

Tabela 12: Identificação dos genótipos dos SNPs para os genes *ABCA7*, *MS4A6A* e *CR1*.

SNP	Alelo 1	Alelo 2	Discriminação Genotípica			Threshold
			Fluorescência do VIC®	Fluorescência do FAM®	Fluorescência VIC® e FAM®	
<i>ABCA7</i> (rs3764650)	G	T	GG	TT	GT	0.30
<i>MS4A6A</i> (rs610932)	G	T	GG	TT	GT	0.35
<i>CR1</i> (rs6656401)	A	G	AA	GG	AG	0.90

4.6. Sequenciamento

Foi realizado sequenciamento de Sanger para validar os genótipos homocigotos e heterocigotos encontrados nos SNPs dos genes *ABCA7* (rs3764650), *MS4A6A* (rs610932) e *CR1* (rs6656401). O validação dos genótipos por sequenciamento foi necessária para a reação da qPCR para formar amostras controles positivas.

Para realizar o sequenciamento, foi feito antes PCR convencional e check-gel das regiões específicas dos SNPs nos genes *ABCA7*, *MS4A6A* e *CR1*. Para o gene *ABCA7*, foi utilizado os *primers* baseados no estudo de Darawi et al., (2013). Para o gene *MS4A6A* e *CR1*, os *primers* foram desenhados. A sequencia de nucleotídios referente aos SNPs em *MS4A6A* (NC 000011.10:g.60171834T>G) e *CR1* (NC 000001.10:g.207692049A>G) foi acessada pelo banco de dados do NCBI (WHEELER et al., 2004). Os *primers Forward* e *Reverse* da fita senso para os genes *MS4A6A* e *CR1* foram desenhados usando a ferramenta do site Primer3 v. 0.4.0 (ROZEN; SKALETSKY, 2000). A sequencia dos *primers* dos genes *ABCA7*, *MS4A6A* e *CR1* estão apresentados na Tabela 13. Posteriormente, foi realizada a PCR convencional no termociclador Veriti® 96 (Applied Biosystems) seguindo

padronizações realizadas para concentrações específicas dos reagentes de PCR e das reações, descritas respectivamente nas Tabelas 14 e 15. Eletroforese em gel foi utilizada para visualizar os produtos da PCR. Para os genes *MS4A6A* e *CR1* foi utilizado gel de poliacrilamida à 7% corado com nitrato de prata e para o gene *ABCA7*, foi utilizado gel de agarose à 2% corado com brometo de etídio. A padronização da eletroforese está descrita na Tabela 16.

Tabela 13: Sequência dos *primers* utilizados nas reações de PCR para sequenciamento.

SNP	Sequência do Primer
<i>ABCA7</i> (rs3764650)	F = AAGACGGAGAGAGGAGGCAT R= CCATCTTCTTCTGCTCTCCCAG
<i>MS4A6A</i> (rs610932)	F= TCTGAGCACCAACAATCA R= GCCTGACATTGACTTCAGCA
<i>CR1</i> (rs6656401)	F= TCCATCTGCAAGCTGTTCT R= TGGCCTCTAAATCCATGTC

F= Sequência Foward 5'-3', R= Sequência Reverse 5'-3'.

Tabela 14: Padronização dos reagentes para a reação da PCR para sequenciamento.

Reagentes	Concentração Inicial	Concentração Final	ABCA7	CR1 e MS4A6A
			Volume (µl)	Volume (µl)
PCR Buffer	10X	1X	2,00	2,00
MgCl ₂	50mM	1,5mM	0,60	0,60
dNTP	10mM	0,2mM	0,40	0,40
Primer Forward	10mM	0,5mM	1,00	1,00
Primer Reverse	10mM	0,5mM	1,00	1,00
Taq DNA Polymerase	5U/µL	0,05U/µL	0,20	0,20
DNA	-	40ng/µL	1,00	1,00
DMSO	-	-	0,5	-
Água Ultrapura	-	-	13.3	13.80
Total	-	-	20,00	20,00

Tabela 15: Padronização da reação de PCR para o sequenciamento.

SNPs	Etapas	Desnaturação		Hibridação	Extensão	Extensão Final
		1	2			
ABCA7 (rs3764650)	N° de ciclos	1	35	35	35	1
	Temperatura	80°C	94°C	62°C	72°C	72°C
	Tempo	5 min.	1 min	30 seg.	51 seg.	5 min.
MS4A6A (rs610932)	N° de ciclos	1	30	30	30	1
	Temperatura	94°C	94°C	64°C	72°C	72°C
	Tempo	5 min	30 seg.	30 seg.	35 seg.	10 min.
CR1 (rs6656401)	N° de ciclos	1	25	25	25	1
	Temperatura	94°C	94°C	64°C	72°C	72°C
	Tempo	5 min	30 seg.	30 seg.	30 seg.	10 min.

Tabela 16: Padronização da Eletroforese em Gel para sequenciamento.

SNPs	Voltagem	Corrente	Potência	Tempo
ABCA7 (rs3764650)	150V	500mA	150W	55 min
MS4A6A (rs610932)	218V	300mA	100W	1h30
CR1 (rs6656401)	180V	300mA	100W	1h30

Para preparar as amostras para o sequenciamento, foram utilizados 5ul de produto de PCR e *primers Forward* de cada gene para reagir com BigDye® Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) seguindo as instruções do fabricante. O sequenciamento foi realizado pelo laboratório do Departamento de Bioquímica no Instituto de Química da USP, SP, coordenado pela Dr^a Suely Lopes Gomes. Utilizou-se o equipamento ABI PRISM® 3130XL GeneticAnalyzer /HITACHI com capilaridade 16 de 50cm (Applied Biosystems) para o sequenciamento. A análise dos eletroferogramas gerados foi realizado pelo BioEdit software v.7.2.5 para windows (Ibis Biosciences) no laboratório NGHM-UFES.

4.7. Análise estatística

A análise estatística foi realizada no programa SPSS (IBM) software versão 23.0 para windows e foi considerado o valor de $p \leq 0,05$ significativo nas análises.

Para comparar entre amostras de pacientes e controles dados de gênero, etnia, escolaridade e APOE status, o teste do qui-quadrado foi realizado. Para etnia, foi considerado Caucasianos e Afrodescendentes. Para escolaridade, foi considerado alfabetizado e não-alfabetizado. Foi considerado status do APOE a presença de pelo menos um alelo E4. Para comparar a idade em pacientes e controles, foi realizado o teste de *Mann-Whitney*.

Para analisar a associação entre os SNPs no genes *ABCA7* (rs3764650), *MS4A6A* (rs610932), *CD33* (rs3865444), *CR1* (rs6656401), *BIN1* (rs744373), *IL-6* (rs1800795) e *CLU* (rs1136000) com a Doença de Alzheimer, foi realizado o teste do qui-quadrado, Odds ratio (OR) e 95% intervalo de confiança (IC).

Para testar a associação dos polimorfismos nos genes *ABCA7* (rs3764650), *MS4A6A* (rs610932), *CD33* (rs3865444), *CR1* (rs6656401), *BIN1* (rs744373), *IL-6* (rs1800795) e *CLU* (rs1136000) com pelo menos um alelo ϵ 4 no gene *APOE*, foi realizada a regressão logística. O valor de $p \leq 0,05$ na regressão logística foi ajustado usando as variáveis idade, gênero, etnia e nível de escolaridade. Essas variáveis foram antes testadas separadamente para mostrar se, individualmente, tem associação para a doença de Alzheimer, uma vez que são fatores de risco para DA. Se mostrado não apresentar associação, poderiam ser usadas nesse modelo ajustado com os polimorfismos.

Para verificar a interação entre os polimorfismos por epistasia estatística, primeiramente foi realizada a regressão logística usando frequência dos alelos dos polimorfismos em estudo individualmente. O valor de p foi ajustado usando as variáveis idade, gênero, etnia, nível de escolaridade e status do *APOE*. Apenas para o gene *APOE* (rs429358 e rs7412) o valor de p não foi ajustado para status do *APOE*. Depois, foi realizada a interação em pares de polimorfismos de uma mesma via patológica na Doença de Alzheimer utilizando a regressão logística devido ao pequeno número amostral (COMBARROS et al., 2009b). Para isso, os genes foram divididos em dois grupos: genes da via inflamatória e da via do metabolismo, tráfego e endocitose de lipídios. Os genes da via inflamatória considerados foram: *ABCA7* (rs3764650), *MS4A6A* (rs610932), *CR1* (rs6656401), *CD33* (rs3865444), *CLU* (rs1136000) e *IL-6* (rs1800795). Os genes da via do metabolismo, tráfego e

endocitose de lipídios foram: *BIN1* (rs744373), *CLU* (rs1136000), *ABCA7* (rs3764650) e *APOE* (rs429358 e rs7412). O valor de p foi ajustado também usando as variáveis idade, gênero, etnia e nível de escolaridade e status do *APOE*. Apenas para as interações com o gene *APOE* (rs429358 e rs7412) o valor de p não foi ajustado para status do *APOE*.

O Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EH-W) foi calculado para amostra de paciente e controle usando a ferramenta *online* OEGE (*Online Encyclopedia for Genetic Epidemiology studies*) (RODRIGUEZ; GAUNT; DAY, 2009) com grau 1 de liberdade. Foi considerado dentro do EH-W o $\chi^2 \leq 3,84$ e $p \geq 0,05$ para cada grupo estudado.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta sessão da dissertação foi dividida em Resultados de Genotipagem (PCR, RFLP, qPCR), Sequenciamento e Análise estatística. A Análise estatística foi apresentada em forma de artigo e a discussão desta dissertação se concentra nos resultados de análise estatística.

O atual trabalho analisou os genes *ABCA7* (rs3764650), *MS4A6A* (rs610932), *CD33* (rs3865444), *CR1* (rs6656401), *BIN1* (rs744373), *IL-6* (rs1800795), *CLU* (rs1136000) e *APOE* (rs429358 e rs7412) com o objetivo de identificar um perfil de biomarcadores genéticos para a Doença de Alzheimer Esporádica em uma amostra de pacientes na população da Grande Vitória-ES.

No presente estudo, a amostra inicial apresentava 241 indivíduos com 159 controles e 82 pacientes. Esse número amostral foi utilizado para o estudo dos genes *IL-6* e *BIN1* inicialmente. No entanto, os demais genes tiveram amostras reduzidas para o número amostral de 224 indivíduos, com 145 controles e 79 pacientes. A explicação para a redução amostral de 17 amostras se deve pelo fato de ao longo do mestrado, algumas dessas amostras acabaram e não puderam ser usadas para a genotipagem dos demais genes. Assim, para parear o novo número amostral em relação à idade e sexo, algumas amostras foram retiradas.

5.1. Resultado de Genotipagem

5.1.1. PCR

O resultado da PCR para os SNPs nos genes *IL-6* (rs1800795), *BIN1* (rs744373), *CD33* (rs3865444), *CR1* (rs6656401), *MS4A6A* (rs610932) e *ABCA7* (rs3764650) podem ser vistos na Figura 13.

O tamanho do fragmento amplificado pela PCR foi, para cada SNP: 305p pares de base (pb) para o gene *IL-6* (rs1800795), 250pb para *BIN1* (rs744373), 164pb para

CD33 (rs3865444), 189pb para *CR1* (rs6656401), 243pb para *MS4A6A* (rs610932) e 846pb para *ABCA7* (rs3764650).

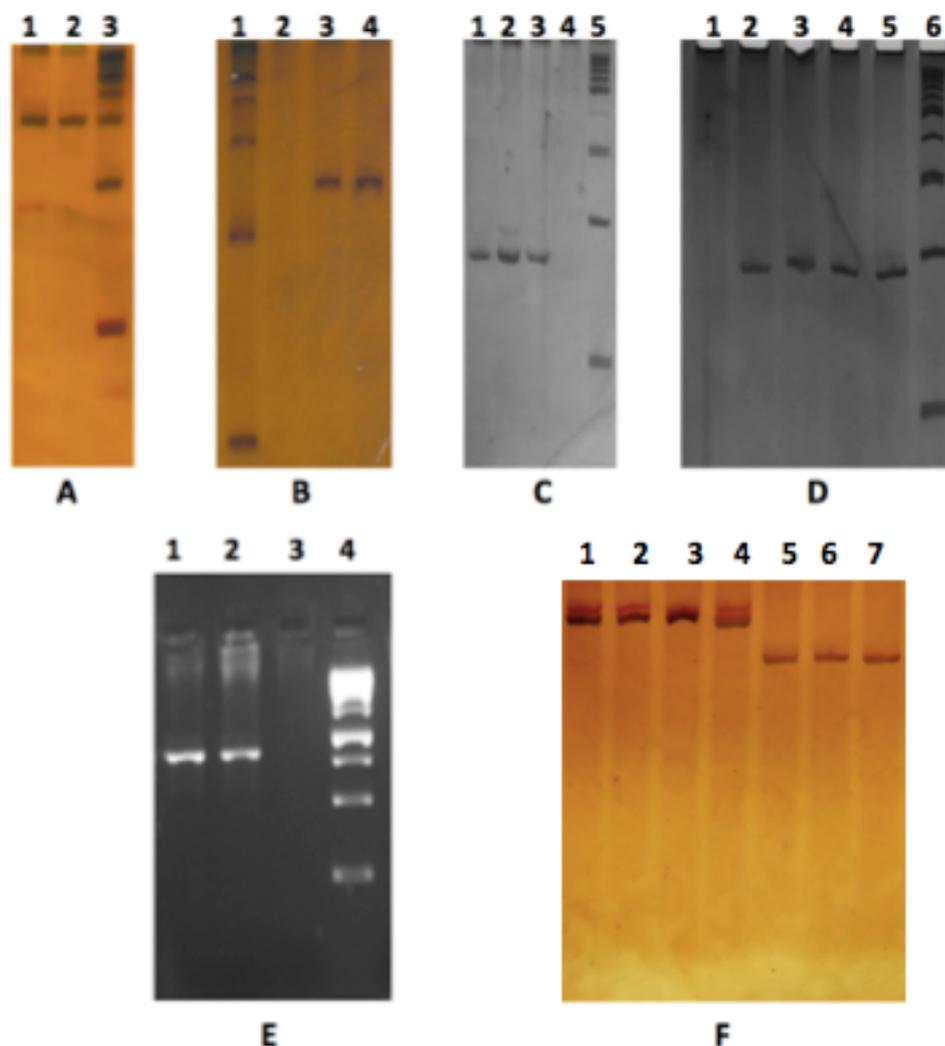


Figura 13. Géis com produto de PCR dos SNPs em estudo. Géis dos genes *IL-6* (rs1800795), *BIN1* (rs744373), *CD33* (rs3865444), *CR1* (rs6656401), *MS4A6A* (rs610932) e *ABCA7* (rs3764650). Géis de poliacrilamida à 7% corado em nitrato de prata (A, B, C, D e F) e Gel de agarose à 2% corado com brometo de etídio (E). **A) Gel do gene *IL-6*.** 1 e 2 = Produto de PCR não digerido com 305 pares de base (pb). 3 = Marcador de peso molecular variando de 100 para 1kilo pb. **B) Gel do gene *BIN1*.** 1 = Marcador de peso molecular variando de 100 para 1kilo pb. 2 = Controle negativo da PCR. 3 e 4 = Produto de PCR com 250pb. **C) Gel do gene *CD33*.** 1, 2 e 3 = Produto de PCR com 164pb. 4 = Controle negativo da PCR. 5 = Marcador de peso molecular variando de 100 para 1kilo pb. **D) Gel do gene *CR1*.** 1 = Controle negativo da PCR. 2,3,4 e 5 = Produto de PCR com 189pb. 6 = Marcador de peso molecular variando de 100 para 1kilo pb. **E) Gel do gene *ABCA7*.** 1 e 2 = Produto de PCR com 846pb. 3 = Controle negativo da PCR. 4 = Marcador de peso molecular variando de 250 para 1kilo pb. **F) Gel do gene *MS4A6A*.** 1 à 4 = Produto de PCR com 243pb. 5 à 7 = Produto de PCR do gene *CR1* com 189pb.

5.1.2. RFLP

O resultado da RFLP para os SNPs nos genes *IL-6* (rs1800795), *BIN1* (rs744373) e *CD33* (rs3865444) podem ser vistos na Figura 14. Todos os fragmentos gerados pela clivagem das enzimas no sítio de restrição específico nos SNPs puderam ser observados, exceto o fragmento de 24pb para o SNP rs744373 no gene *BIN1*. Possivelmente não foi observado no gel, pois deve ter caído do gel durante a corrida eletroforética. No entanto, não comprometeu a análise dos resultados.

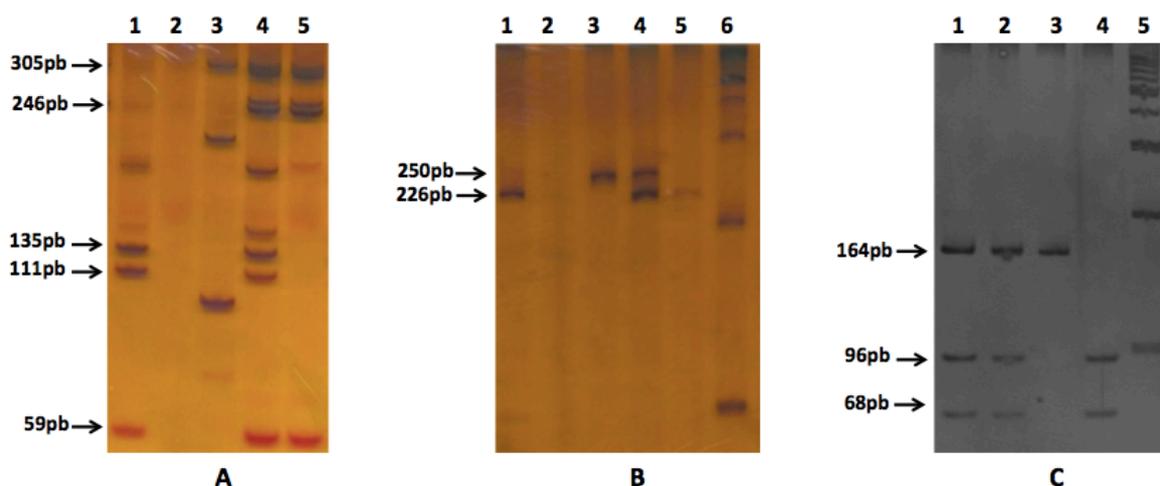


Figura 14: Géis de produtos da Digestão de SNPs em estudo. Géis dos genes *IL-6* (rs1800795), *BIN1* (rs744373) e *CD33* (rs3865444). Géis de poliacrilamida à 7% corado em nitrato de prata, com produtos de PCR digeridos com a enzima restrição *NlaIII* (A), *HinfI* (B) e *NcoI* (C). **A) Gel do gene *IL-6*.** 1= Produto de PCR digerido com genótipo CC (fragmentos de bandas: 135pb, 111pb and 59pb). 2= Controle negativo da digestão. 3= Marcador de peso molecular variando de 100 para 500 pb. 4= Produto de PCR digerido com o genótipo GC (fragmentos de bandas: 246pb, 135pb, 111pb e 59pb). 5= Produto de PCR digerido com o genótipo GG (fragmentos de bandas: 246pb e 59pb). **B) Gel do gene *BIN1*.** 1 e 5= Produto de PCR digerido com o genótipo TT e fragmento de banda 226 pares de base (pb); 2= Controle negativo da digestão. 3 = Produto de PCR digerido com genótipo CC (fragmento de banda 250pb). 4= Produto de PCR digerido com o genótipo TC (fragmentos de banda 250pb e 226 pb). 6= Marcador de peso molecular variando de 100 para 1kilo pb. **C) Gel do gene *CD33*.** 1 e 2 = Produto de PCR digerido com genótipo TG (fragmentos 164pb, 96pb and 68pb). 3= Produto de PCR digerido com genótipo TT (fragmento 164pb). 4= Produto de PCR digerido com genótipo GG (fragmentos 96pb e 68pb). 5= Marcador de peso molecular variando de 100 para 1kilo pb.

5.1.3. qPCR

O resultado da qPCR para os SNPs nos genes *ABCA7* (rs3764650), *MS4A6A* (rs610932) e *CR1* (rs6656401) podem ser observados nas figuras 15, 16 e 17, respectivamente.

Todos os genótipos padrão esperados para cada SNP foram encontrados na amostra. As amostras que apresentaram o genótipo AA do SNP rs6656401 no gene

CR1 tiveram gráficos de fluorescência com um padrão específico, com a fluorescência da sonda para Alelo 2 - G (FAM®) mais elevada, caracterizando à princípio, a interpretação de um padrão típico de genótipo heterozigoto. No entanto, o sequenciamento de Sanger realizado com essas amostras validou o genótipo AA encontrado.

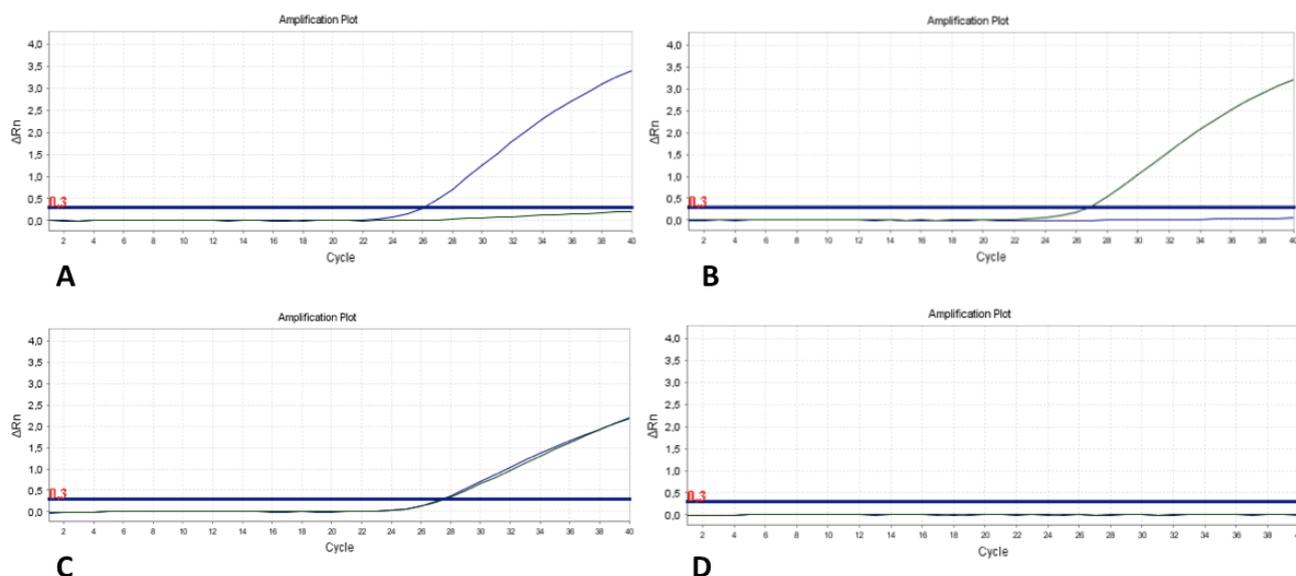


Figura 15: Gráfico de fluorescência em ΔRn x ciclos de amostras para o SNP rs3764650 no gene *ABCA7*. O Threshold está designado pela linha azul grossa com valor de 0.3 de fluorescência. Linha verde (VIC®) e azul (FAM®) estão designadas para alelos G e T, respectivamente. A) Amostra com genótipo TT. B) Amostra com genótipo GG. C) Amostra com genótipo TG. D) Controle negativo da qPCR.

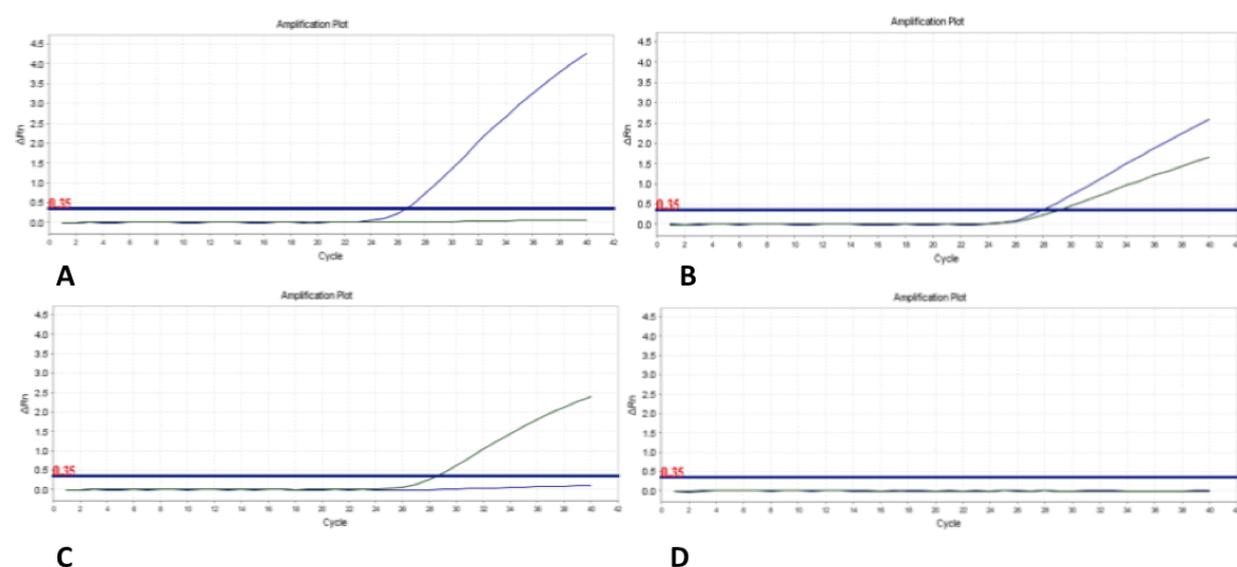


Figura 16: Gráfico de fluorescência em ΔRn x ciclos de amostras para o SNP rs610932 no gene *MS4A6A*. O Threshold está designado pela linha azul grossa com valor de 0.35 de fluorescência. Linha verde (VIC®) e azul (FAM®) estão designadas para alelos C e A, respectivamente. A) Amostra

com genótipo AA. B) Amostra com genótipo AC. C) Amostra com genótipo CC. D) Controle negativo da qPCR.

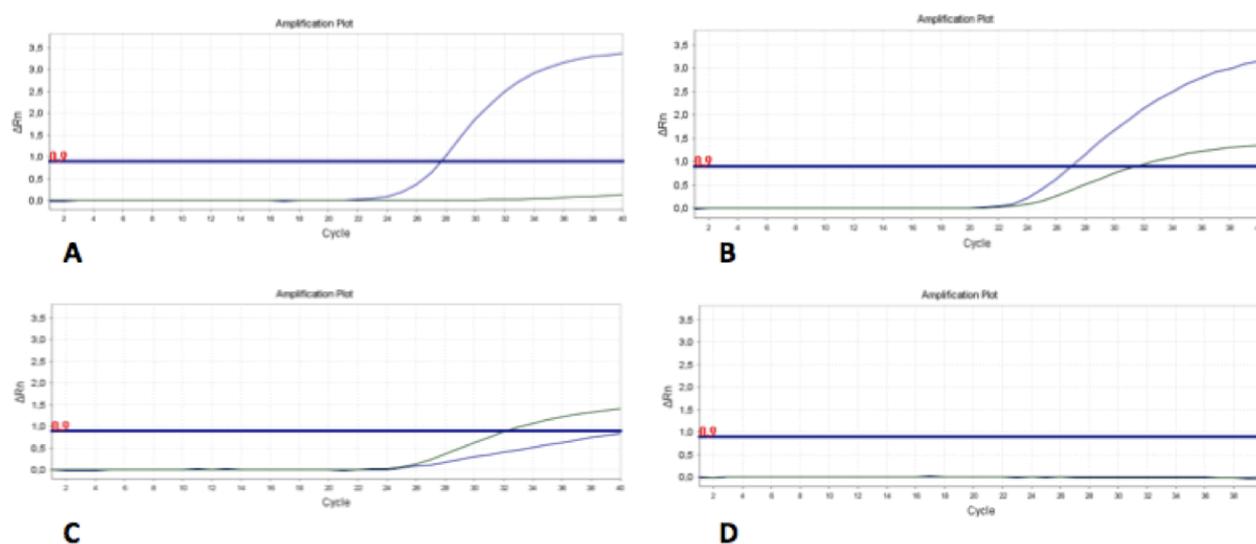


Figura 17: Gráfico de fluorescência em ΔRn x ciclos de amostras para o SNP rs6656401 no gene *CR1*. O Threshold está designado pela linha azul grossa com valor de 0.90 de fluorescência. Linha verde (VIC®) e azul (FAM®) estão designadas para alelos A e G, respectivamente. A) Amostra com genótipo GG. B) Amostra com genótipo GA. C) Amostra com genótipo AA. D) Controle negativo da qPCR.

5.2. Resultado de Sequenciamento

O resultado do sequenciamento de Sanger para validar genótipos padrões nos SNPs dos genes *CR1* (rs6656401), *ABCA7* (rs3764650), *CD33* (rs3865444) e *MS4A6A* (rs610932), estão na figura 18. Todos os genótipos padrões foram sequenciados.

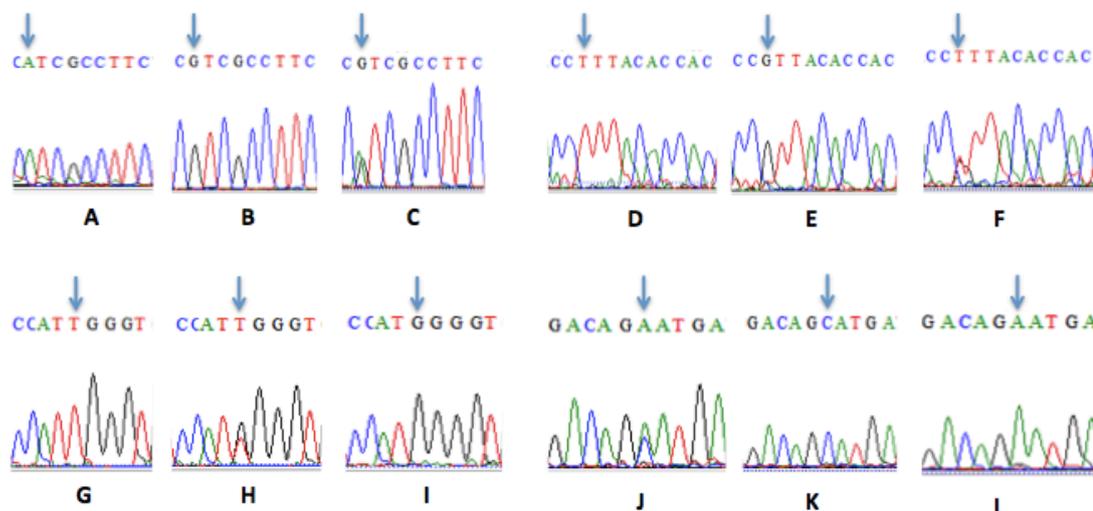


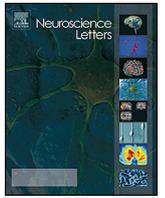
Figura 18. Eletroferogramas obtidos pelo o sequenciamento de Sanger dos SNPs nos genes *CR1*, *ABCA7*, *CD33* e *MS4A6A*. **A, B e C**) Genótipo AA, GG e GA, respectivamente, do SNP rs6656401 no gene *CR1*. **D, E e F**) Genótipos TT, GG e TG, respectivamente, do SNP rs3764650 no gene *ABCA7*. **G, H e I**) Genótipos TT, TG e GG, respectivamente, do SNP rs3865444 no gene *CD33*. **J, K e L**) Genótipos AC, CC e AA, respectivamente, do SNP rs610932 no gene *MS4A6A*.

5.3. Resultado de Análise Estatística

Os resultados da análise estatística desse estudo levaram a submissão e publicação dos seguintes artigos científicos:

- *Association study of the BIN1 and IL-6 genes on Alzheimer's disease* - publicado na revista *Neuroscience Letter* em Janeiro de 2016.
- *Validating GWAS's variants from microglial genes implicated in Alzheimer disease* - manuscrito submetido em análise na revista *Journal of Molecular Neuroscience*.
- *Epistasis interaction among BIN1, CLU and APOE genes in Alzheimer disease* - manuscrito submetido na revista *Neuroscience Letter*.

Os resultados estatísticos e a discussão da dissertação foram apresentados em formato de artigo. Para os artigos em submissão, foram incluídos os comprovantes de submissão e os artigos na íntegra.



Research paper

Association study of the *BIN1* and *IL-6* genes on Alzheimer's disease

Lígia Ramos dos Santos^{a,b,*}, Luciano Belcavello^a, Daniela Camporez^{a,b},
Caerê Iamonde Maciel de Magalhães^c, Eliana Zandonade^c, Renato Lírio Morelato^d,
Flavia Imbroisi Valle Errera^{a,e}, Iuri Drumond Louro^{a,b},
Marial Do Carmo Pimentel Batitucci^{a,f}, Flavia de Paula^{a,b}

^a Núcleo de Genética Humana e Molecular, Departamento de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Humanas e Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, Brazil

^c Laboratório de Estatística (LESTAT), Centro de Ciências Exatas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, Brazil

^d Hospital da Santa Casa de Misericórdia de Vitória, Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória, Vitória, ES, Brazil

^e Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória, Vitória, ES, Brazil

^f Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, Brazil

HIGHLIGHTS

- *BIN1* (rs744373) and *IL-6* (rs1800795) SNPs were studied in Alzheimer's disease (AD).
- No association with AD for both SNPs in a located southeast Brazilian population.
- The results suggest that they were not implicated with AD for all populations.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 October 2015

Received in revised form 7 December 2015

Accepted 21 December 2015

Available online 28 December 2015

Keywords:

Alzheimer's disease

Case-control study

–174 G/C *IL-6*

Brazilian population

ABSTRACT

Genome-wide association study (GWAS) has identified several novel genes associated with the risk of Alzheimer's disease (AD), which is a progressive neurodegenerative disease in elders. However, most of the novel genes have not been validated through replication in separated populations. Among them, the *BIN1* gene is involved in endocytosis and intracellular trafficking as well as in the formation of β amyloid plaques and neurofibrillary tangles, which are the main pathological hallmarks of AD. The *IL-6* gene has also been frequently associated with AD; however, consistent results have not been found. *IL-6*, a cytokine from the immune system, is implicated in the pathogenesis of several degenerative diseases. Similar to *BIN1*, it is suggested that *IL-6* is also involved in the formation of β amyloid plaques. In this case-control study, we aimed to investigate whether single nucleotide polymorphisms in the *BIN1* (rs744373) and *IL-6* (rs1800795) genes are associated with AD. Genotype frequencies were evaluated via PCR-RFLP in 82 late-onset AD patients and 159 elderly healthy controls, who were matched by age and gender. In this study, no association was found for either polymorphism, suggesting that these genes are not implicated in the aetiology of AD in all populations.

© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

* Corresponding author at: Laboratório de Genética Humana e Molecular, Departamento de Ciências Biológicas, CCHN, Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Mal. Campos 1468, Maruípe 29043-900, Vitória, ES, Brazil. Fax: +55 27 33357250.

E-mail addresses: ligia.ramos.santos@gmail.com (L. Ramos dos Santos), belcavello@gmail.com (L. Belcavello), danielacamporez@gmail.com (D. Camporez), magalhaes.caere@gmail.com (C. Iamonde Maciel de Magalhães), elianazandonade@uol.com.br (E. Zandonade), renato.morelato@hotmail.com (R. Lírio Morelato), flavia.errera@gmail.com (F. Imbroisi Valle Errera), lurilouro@yahoo.com (I. Drumond Louro), docarmo.batitucci@yahoo.com.br (M. Do Carmo Pimentel Batitucci), flapvit@yahoo.com.br (F. de Paula).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2015.12.046>

0304-3940/© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Dementia is a neurocognitive disorder in elderly people that affect memory, language and learning ability. In 2013, it was estimated that there were 44 millions people with dementia worldwide. An extreme type of dementia is Alzheimer's disease (AD), which this accounts for 60 to 80% of dementia cases [1]. This neurodegenerative disease is characterized by memory and cognitive damage. Pathologically, it is characterized by two changes inside the brain cortex: neurofibrillary tangles and plaques of β amyloid

that implicate in increasing levels of inflammation, neuronal death and brain atrophy [2].

Mutations in the genes *APP* (amyloid precursor protein), *PSEN1* (presenilin 1) and *PSEN2* (presenilin 2) accounts for 5% of AD cases with Mendelian patterns and lead to the early onset of the disease. In some cases where the disease appears after the age of 65, considered late-onset AD (LOAD), there are multifactorial causes, with genetic and environmental causes [2]. Currently, the only gene with a susceptibility risk factor that has been well established for LOAD is *APOE* (apolipoprotein E) from the $\epsilon 4$ allele. Therefore, efforts are being made to identify more variants corresponding to the risk of LOAD [3].

The large genome-wide association study (GWAS) scanned the entire human genome to discover novel genes leading to AD susceptibility [4]. The recently discovered, *Bridging integrator 1* (*BIN1*) gene was one of the novel variants. GWAS analyses disclosed a single nucleotide polymorphism (SNP), rs744373, in *BIN1* as being associated with AD [5]. The *BIN1* gene is involved in many cellular processes, including endocytosis, apoptosis and signal transduction [2]. The protein from *BIN1* interacts with the Tau protein, suggesting that it plays a role in the formation of neurofibrillary tangles. Due to this endocytosis activity, *BIN1* may play a role in β amyloid plaque formation in the pathogenesis of AD [6].

The pathway that leads to the pathogenic elements of AD is crossed with the inflammatory process [7]. The human *Interleukin-6* gene (*IL-6*) is a major cytokine and is implicated in the pathogenesis of many inflammatory diseases, such as AD [8]. The *IL-6* gene has a polymorphism, -174G/C (rs1800795), in the promoter region, and previous studies have found that it was associated with AD [9–11].

This study attempts to investigate the relationship of rs744373 *BIN1* and -174G/C *IL-6* with LOAD in samples from southeastern Brazil. The validation of the polymorphisms through a case-control study was important to enhance our knowledge about the pathways leading to the development of AD, and also to trace disease-related risk factors in distinct populations.

2. Materials and methods

2.1. Subjects

In this case-control study, a total of 241 individuals were included 82 patients with a diagnosis of LOAD according to the criteria of the National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA), and 159 healthy controls matched for sex and age. Information on gender, age, ethnical background composition, age at onset of disease, *APOE* status, schooling, scale of Mini-Mental State Examination (MMSE) and Clinical Dementia Rating Scale (CDR) in patients and controls is given in Table 1. This study was accepted by the Ethics Committee of Human Research of Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória, ES, Brazil, and all of the elderly or their relatives gave a written informed consent to participate. The elderly selected (case and controls) to participate in this study were from Vitória, ES, in the southeastern part of Brazil.

The participants, including healthy controls and patients, were assisted at the Geriatric Unity of the Hospital Santa Casa de Misericórdia de Vitória (HSCMV) and at the Centro de Referência de Atendimento ao Idoso (CRAI), both at ES, Brazil. All participants were diagnosed at the Neurogeriatric Unity at HSCMV and CRAI.

The patients were diagnosed for probable AD, with a comprehensive diagnostic evaluation for dementia, and fulfilled others criteria, such as MMSE; and the Clinical Dementia Rating Scale (CDR).

Table 1
Demographic and clinical characteristics of AD patients and controls.

	AD n(%)	Controln(%)
Total sample	82 (100%)	159 (100%)
Gender		
Woman	54 (65.9%)	116 (73.0%)
Man	28 (34.1%)	43 (27.0%)
Schooling		
Literati	44 (53.7%)	101 (63.5%)
Illiterate	38 (46.3%)	58 (36.5%)
Ethnical background		
Caucasians*	47 (57.3%)	88 (55.3%)
Afro-Brazilians	35 (42.7%)	71 (44.7%)
<i>APOE</i> status		
$\epsilon 4+$	35 (42.7%)	111 (69.8%)
$\epsilon 4-$	47 (57.3%)	48 (30.2%)
	AD mean SD	Control mean SD
Age	81.2 \pm 7.5	79.2 \pm 7.8
Onset of disease	4	–
MMSE	14–4	>28
CDR	15 \pm 4	–

Numbers with percentages in parenthesis show the proportions of AD patients and healthy controls; * = Brazilian descendants of Caucasians; $\epsilon 4+$ = $\epsilon 4$ carries; $\epsilon 4-$ = $\epsilon 4$ non-carries; SD = standard deviation; MMSE = Mini-Mental State Examination (value considering the schooling level of controls and patients and the average evolution time of the disease in AD patients); CDR = Dementia Rating Scale (mild and moderate dementia); > = Greater than.

2.2. Blood sampling

Blood was collected at the Geriatric Unity of HSCMV and CRAI, between 2007 and 2008. Genomic DNA was extracted from 5 mL of peripheral blood and collected into tubes containing 5% EDTA following a previous methodology [12].

2.3. 174G/C *IL-6* polymorphism genotyping

The polymorphism was determined by the conventional Polymerase Chain Reaction–Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR–RFLP) technique, using previously published primers [13]. PCR was performed on a Veriti® 96 (Applied Biosystems) with the following conditions: denaturation at 94 °C for 4 min, followed by 28 cycles at 94 °C for 30 s, 62 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s, and an extra extension phase at 72 °C for 10 min. Then, 20 μL of the PCR products were generated using a MIX tube of 1X PCR Buffer, 1.5 mM MgCl_2 , 10 pmol of each primer, 0.2 mM of deoxynucleotide triphosphates, 0.05 units/ μL of Taq DNA polymerase and 20 ng of DNA. The PCR products were electrophoresed for 1 h and 50 min at 200 V, 300 mA and 100 W on a 7% polyacrylamide gel. The gel was stained with silver nitrate, and the amplification of the 305-base-pair (bp) fragment was visualized. After amplification, 10 μL of the PCR products was subjected to digestion at 37 °C overnight with 0.2 units of *NlaIII* (New England Biolabs, USA). The digestion products were electrophoresed on a 7% polyacrylamide gel stained with silver nitrate with the same protocol used on the electrophoresed PCR products.

2.4. rs744373 polymorphism in *BIN1* genotyping

The polymorphism was determined by the conventional PCR–RFLP technique using degenerated primers designed by Primer3 v.0.4.0 web software [14]. The forward primer (5'-CACCAGGGACAGGCAGGTCTGAGAC-3') was degenerated at nucleotide A localized at the end of the primer, and the reverse primer (5'-CACATCTTAGCCACAGAACAGG-3') was not degenerated.

The A nucleotide on the degenerated primer formed the restriction site (GANTC) for *HinfI*, which was selected by dCAPS Finder 2.0 [15] for digestion. The T nucleotide from the T>C polymorphism created a site (GANTC) for the *HinfI* restriction enzyme, while the C nucleotide did not allow digestion. The PCR was performed with a Veriti® 96 (Applied Biosystems) using these conditions: denaturation at 94 °C for 4 min, followed by 32 cycles at 94 °C for 30 s, 72 °C for 30 s, 72 °C for 30 s, and an extra extension phase at 72 °C for 10 min. Then, 10 µL of PCR products were generated using a MIX tube of 1X PCR Buffer, 1.5 mM MgCl₂, 10 pmol of each primer, 0.2 mM of deoxynucleotide triphosphates, 0.05 units/µl of Taq DNA polymerase and 20 ng of DNA. The PCR products were electrophoresed for 2 h and 15 min at 200 V, 300 mA and 100 W on a 7% polyacrylamide gel and later stained with silver nitrate. The amplification of the 250-base-pair fragment was visualized. After electrophoresis, 5 µL of the amplified PCR products were subjected to digestion at 37 °C overnight with 0.2 units of *HinfI* (New England Biolabs, USA). The digestion products were electrophoresed on a 7% polyacrylamide gel stained with silver nitrate following the same protocol used on the electrophoresed PCR products.

2.5. Statistical analysis

Pearson's chi-square test was performed using the SPSS software v. 20, for Windows [16] to compare frequency differences for each genotype between the samples. The Pearson's chi-square test is a statistical test applied to sets of categorical data to evaluate how likely it is that any observed difference between the sets arose by chance [17]. To test the association between the *APOE* ε4 status and polymorphisms –174 G/C *IL-6* and rs744373 *BIN1*, a logistic regression analysis through SPSS software v. 20, for Windows was used [16]. The logistic regression analysis has a binary logistic model to estimate the probability of a binary response based on one or more independent variables [18]. The p value in the logic regression was adjusted using age, gender, school level and ethnical background as variables, since those variables are risk factors for Alzheimer's disease and can influence the diagnose of the disease. Moreover, we calculated the Hardy-Weinberg Equilibrium (H-WE), performed with 1 degree of freedom. $p \leq 0.05$ was considered statistically significant. The genotype frequency of the *APOE* ε4 status was inferred in our previously study [19].

3. Results

rs744373 *BIN1* did not deviate from the predicted Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) in both healthy controls and AD patients. There was a genotype distribution of –174 G/C *IL-6* in HWE in AD patients, but not in healthy controls. Therefore, we randomly re-genotyped 20 (12.5%) individual control samples, and all of them matched the previously determined genotype.

The genotype frequencies in AD patients and healthy controls of –174 G/C *IL-6* and rs744373 *BIN1* are shown in Table 2. The *IL-6* GG genotypes were most frequent in AD patients (61%), and in healthy controls its frequency was slightly higher (49.7%) than GC (49.1%). The genotype CC was the least frequented in AD patients (1.2%) and in healthy controls (1.3%). There was no statistically significant difference in the *IL-6* GG, GC and CC genotypes between AD patient and healthy control groups. The TC genotype for the rs744373 polymorphism had the greatest frequency in AD patients (47.6%) and healthy controls (49%) compared with other genotypes, while the CC genotype was lower in AD patients (8.5%) and healthy controls (10.1%). No statistical significance was observed for the TT, TC and CC genotypes in the AD patient and healthy control groups.

The logistic regression analysis results for rs744373 *BIN1* are shown in Table 3. The –174 G/C *IL-6* polymorphism was not

Table 2

Genotypes frequencies of –174 G/C *IL-6*, rs744373 *BIN1* and the *APOE* status in AD patients and healthy controls.

	AD	Control	p Value
<i>IL-6</i>			
GG	50 (61%)	79 (49.7%)	0.246
GC	31 (37.8%)	78 (49.1%)	
CC	1 (1.2%)	2 (1.3%)	
Total	82 (100.0%)	159 (100.0%)	
<i>BIN1</i>			
TT	36 (43.9%)	65 (40.9%)	0.872
TC	39 (47.6%)	78 (49.0%)	
CC	7 (8.5%)	16 (10.1%)	
Total	82 (100.0%)	159 (100.0%)	
<i>APOE</i>			
ε4+	35 (42.7%)	111 (69.8%)	0.000
ε4–	47 (57.3%)	48 (30.2%)	
Total	82 (100.0%)	159 (100.0%)	

Numbers with percentages in parenthesis show the proportions of genotypes in AD patients and healthy controls; p value = AD patient versus healthy control; p value considerer ≤ 0.05 ; ε4+ = ε4 carries; ε4– = ε4 non-carries.

Table 3

Logistic regression analyses for the association of AD with rs744373 *BIN1*.

	AD (%)	Control (%)	OR (95%CI)	p Value*	OR (95%CI)	p value**
<i>BIN1</i>						
TC	47.6	49.0	1 (reference)	–	1 (reference)	–
TT	43.9	40.9	1.11 (0.63–1.94)	0.720	1.20 (0.66–2.19)	0.547
CC	8.5	10.1	0.86 (0.33–2.30)	0.787	0.79 (0.28–2.26)	0.660

OR = Odds ratio; CI = Confidence interval; p value considerer ≤ 0.05 ; * = crude p value; ** = p value adjusted by the variables age, gender, educational attainment, ethnical background and *APOE* ε4 status.

assessed for logistic regression analysis because its genotype distribution in the control group was not in HWE. After adjusting for age, gender, educational attainment, and *APOE* ε4 status, the logistic regression analysis showed no associations for AD with the CC genotype of *BIN1* ($p = 0.660$; OR = 0.79; 95% CI = 0.28–2.26) or the TT genotype ($p = 0.547$; OR = 1.20; 95% CI = 0.66–2.19).

4. Discussion

Genome-wide association study identified new variants associated with the risk for Alzheimer's disease; however, most of the associations need to be replicated in separated populations for validation. In this study, we investigated whether the rs744373 *BIN1* and –174 G/C *IL-6* polymorphisms were associated with AD. Although the *BIN1* gene is one of the most relevant genes in AD, our sample population showed no association. We also did not detect an association between the –174 G/C *IL-6* polymorphism and AD.

The *BIN1* protein is involved in endocytosis and intracellular trafficking. Therefore, this protein may play a role in the pathway leading to AD because it could affect the transport and processing of APP inside cells, resulting in β amyloid plaque formation [2]. This hypothesis was supported by studies that found elevated levels of the *BIN1* protein in AD brains, because *in vitro* and *in vivo* studies showed molecular interactions between the *BIN1* protein and Tau, the main protein involved in the formation of neurofibrillary tangles [6].

The rs744373 *BIN1* polymorphism showed a significant risk association for AD in GWAS studies as well as in LOAD meta-analyses studies from AlzGene (OR = 1.17, 95% CI = 1.13–1.20). Furthermore, it ranks second in the top results for genes with positive associations with AD (OR = 1.166, 95% CI = 1.13–1.20), suggesting a strong relationship with the disease [20]. This poly-

morphism also showed a positive association with AD in the case-control study of Lambert et al. [21], in Spanish (OR = 1.43; 95% CI = 1.22–1.68) and Italian (OR = 1.22; 95% CI = 1.07–1.38) populations. However, the same study did not find an association for AD in populations from Finland, which was similar to our study. Lambert et al. [21] used a logistic regression with an additive genetic model considering gender, age and disease status to test whether the SNP was associated with AD; our study used a different statistical approach to test the association; with a Chi-square test. Moreover, our sample ($n = 241$) was minor compared with their study (Italian, $n = 2725$; Spanish $n = 1555$; Finland, $n = 1092$). The sample size and statistical analyses may have influenced the detection limits of association in our sample population. Additionally, another factor to consider is that the Brazilian population is a mixture, with ancestry derivatives from Iberian Caucasians, West Africans and Native Americans [22,23]. This ethnical background variability could mask some gene markers for AD [24], such as variants in the *BIN1* gene, in the Brazilian population. When co-related with *APOE* $\epsilon 4$ carriers [21], the study found no association for the rs744373 *BIN1* polymorphism and AD in the three samples studied. Our data also used a logistic regression adjusted for age, gender, educational attainment, ethnical background and *APOE* $\epsilon 4$ status and did not find a significant association.

In Alzheimer's disease, the formation of the β amyloid peptide can induce microglia and astrocytes to secrete immune system elements, such as cytokine interleukin 6 [25]. The *IL-6* gene is localized on chromosome 7p21 [7] and is thought to increase the amount of protein in β amyloid plaques. Moreover, elevated levels of *IL-6* have been found in the early formation of β amyloid plaques and have only been detected only in brains with AD, not in those of the elderly without AD [25,26].

The polymorphism -174G/C in the *IL-6* gene alters the rate of gene transcription and serum levels in AD patient brains, indicating its role in the development of AD [27]. However, the association of the -174G/C *IL-6* polymorphism with AD is not consensual. From 22 case-control studies of the -174G/C *IL-6* risk association for AD listed on AlzGene [20] for Caucasians, 12 showed positive associations, 9 showed negative associations and 1 indicated a trend for LOAD. Furthermore, the majority of studies in European individuals did not find significant association for this polymorphism with AD [28–34]. Studies in Brazilian populations with the -174G/C *IL-6* polymorphism are scarce and not consensual. In the study of Morais et al. [11], the C allele of -174G/C *IL-6* was associated with AD in a dominant model analysis, using a sample located in the midwest region of Brazil (Brasília) consisting of 532 individuals (120 AD patients; 412 controls). The study by Rasmussen et al. [35] went in the opposite direction. In a sample of 365 individuals (200 AD patients; 165 controls) from São Paulo city, no association was found for -174G/C *IL-6* using the Chi-Square test [33]. The reasons for the conflicting results may be explained by the interaction of -174G/C *IL-6* with other SNPs. For instance, Rasmussen et al. [35] found a protective association for AD in the *IL-6* gene when allele A of -597G/A was associated with allele G of -174G/C , suggesting that the same gene may interact as a haplotype that changes the odds for AD. Additionally, in the Mansoori et al. [36] study, the T allele of the SNP rs1801133 in the methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) gene interacted with the C allele of -174G/C *IL-6* to increase risk of AD (OR = 2.5) in an Italian population. *MTHFR* is an important gene in the metabolism of folate (acid folic) and homocysteine [37]. In our study, this polymorphism showed no association with AD. We believe that *IL-6* plays a role in the disease that may be under powered alone, and it is necessary to consider its interactions with others SNPs for associations with AD.

Case-control studies are important to trace susceptibility genes because each population may have different markers for LOAD. Association studies are essential to validate novel genes disclosed

by GWAS, and the results can improve our knowledge on treatment strategies for AD. Although diverse studies have reported indirect contributions of -174G/C *IL-6* and rs744373 *BIN1* in the formation of neurofibrillary tangles and β amyloid plaques, it is still not fully understood how either SNP drives AD development [2,25]. Therefore, both polymorphisms require more research to better elucidate their role in the aetiology of AD.

5. Conclusion

Our data suggests that the -174G/C *IL-6* and rs744373 *BIN1* polymorphisms do not have an association with sporadic AD when stratified for allele $\epsilon 4$ of *APOE* in a small population from one location in southeast Brazil.

Authors' contributions

Lígia Ramos dos Santos and Flavia de Paula were the main researchers and wrote the manuscript. Lígia Ramos dos Santos performed the experimental procedures. Daniela Camporez and Luciano Belcavello collected the DNA samples and participated in the experimental procedures. Renato Lírio Morelato contributed as physician support and helped with the clinical assessment of the recruited subjects. Caerê Iamonde Maciel de Magalhães and Eliana Zandonade contributed to the statistical analyses. Flavia de Paula, Flavia Imbroisi Valle Errera, Iuri Drumond Louro and Maria Do Carmo Pimentel Batitucci were involved in the scientific support of the research. All of the authors participated in manuscript preparation, and read and approved it before submission.

Disclosure

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments

We appreciated the assistance and technical support of the researchers from the Núcleo de Genética Humana e Molecular – NGH.M. We thank the Laboratório de Estatística (LESTAT) for statistical support. This study was financially supported by the Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, FAPES/Decit/SCTIE/MS, FACITEC, MCTI, CNPQ, MEC/CAPES.

References

- [1] Alzheimer's Disease Facts and Figures, *Alzheimer's & Dementia*, 10, 2 (2014).
- [2] M.S. Tan, J.T. Yu, L. Tan, Bridging integrator 1 (*BIN1*): form, function, and Alzheimer's disease, *Trends Mol. Med.* 19 (2013) 594–603, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2013.06.004>.
- [3] J.C. Lambert, P. Amouyel, Genetics of Alzheimer's disease: new evidences for an old hypothesis? *Curr. Opin. Genet. Dev.* 21 (2011) 295–301, <http://dx.doi.org/10.1016/j.gde.2011.02.002>.
- [4] G. Liu, S. Zhang, Z. Cai, Y. Li, L. Cui, G. Ma, et al., *BIN1* gene rs744373 polymorphism contributes to Alzheimer's disease in East Asian population, *Neurosci. Lett.* 544 (2013) 47–51, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2013.02.075>.
- [5] D. Harold, R. Abraham, P. Hollingworth, R. Sims, M. Hamshere, J.S. Pahwa, et al., Genome-wide association study identifies variants at *CLU* and *PICALM* associated with Alzheimer's disease, and shows evidence for additional susceptibility genes, *Nat. Genet.* 41 (2009) 1088–1093, <http://dx.doi.org/10.1038/ng.440>, Genome-wide.
- [6] J. Chapuis, F. Hansmannel, M. Gistelincq, A. Mounier, C. Van Cauwenberghe, K.V. Kolen, et al., Increased expression of *BIN1* mediates Alzheimer genetic risk by modulating tau pathology, *Mol. Psychiatry* 18 (2013) 1225–1234, <http://dx.doi.org/10.1038/mp.2013.1>.
- [7] I. Shawkatová, J. Javor, Z. Párnická, L. Vrazda, M. Novák, M. Buc, No association between cytokine gene polymorphism and risk of Alzheimer's disease in Slovaks, *Acta Neurobiol. Exp. (Wars)* 70 (2010) 303–307.
- [8] M. Erta, A. Quintana, J. Hidalgo, Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system, *Int. J. Biol. Sci.* 8 (2012) 1254–1266, <http://dx.doi.org/10.7150/ijbs.4679>.

- [9] F. Faltraco, K. Bürger, P. Zill, S.J. Teipel, H.J. Möller, H. Hampel, et al., Interleukin-6-174 G/C promoter gene polymorphism C allele reduces Alzheimer's disease risk, *J. Am. Geriatr. Soc.* 51 (2003) 578–579, <http://dx.doi.org/10.1046/j.1532-5415.2003.51177.x>.
- [10] F. Licastro, L.M.E. Grimaldi, M. Bonafè, C. Martina, F. Olivieri, L. Cavallone, et al., Interleukin-6 gene alleles affect the risk of Alzheimer's disease and levels of the cytokine in blood and brain, *Neurobiol. Aging* 24 (2003) 921–926, [http://dx.doi.org/10.1016/s0197-4580\(03\)00013-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0197-4580(03)00013-7).
- [11] C.F. Moraes, A.L. Benedet, V.C. Souza, T.C. Lins, E.F. Camargos, J.O.S. Naves, et al., Cytokine gene polymorphisms and Alzheimer's disease in Brazil, *Neuroimmunomodulation* 20 (2013) 239–246, [10.1159/000350368](https://doi.org/10.1159/000350368).
- [12] S.A. Miller, D.D. Dykes, H.F. Polesky, A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells, *Nucleic Acids Res.* 16 (1988) 1215, <http://dx.doi.org/10.1093/nar/16.3.1215>.
- [13] O. Olomolaiye, N.A. Wood, J.L. Bidwell, A novel niaiii polymorphism in the human IL-6 promoter, *Eur. J. Immunogenet.* 25 (1998) 267.
- [14] S. Rosen, H.J. Skaletsky, Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers, in: S. Krawetz, S. Misener (Eds.), *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*, Humana Press, New York, 2002, pp. 365–386.
- [15] M.M. Neff, E. Turk, M. Kalishman, Web-based primer design for single nucleotide polymorphism analysis, *Trends Genet.* 18 (2002) 613–615 <http://helix.wustl.edu/dcaps/dcaps.html>.
- [16] Statistical Package for the Social Sciences (SPSS). Version 20.0. [Computer program]. New York: IBM Corp (2011).
- [17] K. Pearson, On the criterion that a given system of deviations from the probable in the case of a correlated system of variables is such that it can be reasonably supposed to have arisen from random sampling, *Philos. Mag. Ser.* 5 (50) (1900) 157–175, <http://dx.doi.org/10.1080/14786440009463897>.
- [18] D. Cox, The regression analysis of binary sequences (with discussion), *J. Roy Stat. Soc.* 20 (1958) 215–242.
- [19] B.V.P. de-Almada, L.D. de-Almeida, D. Camporez, M.V.D. de-Moraes, R.L. Morelato, A.M.S. Perrone, et al., Protective effect of the APOE-e3 allele in Alzheimer's disease, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 45 (2012) 8–12, <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3854133&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (accessed September 24, 2015).
- [20] L. Bertram, M. McQueen, K. Mullin, D. Blacker, R. Tanzi, = The AlzGene database. (2006). Available at <http://www.alzgene.org>. accessed (03.15).
- [21] J.C. Lambert, D. Zelenika, M. Hiltunen, V. Chouraki, O. Combarros, M.J. Bullido, et al., Evidence of the association of BIN1 and PICALM with the AD risk in contrasting European populations, *Neurobiol. Aging* 32 (2011) 756.e11–756.e15, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.11.022>.
- [22] S.D.J. Pena, G. di Pietro, M. Fuchshuber-Moraes, J.P. Genro, M.H. Hutz, F.D.S.G. Kehdy, et al., The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected, *PLoS One* 6 (2011), <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0017063>.
- [23] T.C. Lins, R.G. Vieira, B.S. Abreu, D. Grattapaglia, R.W. Pereira, Genetic composition of Brazilian population samples based on a set of twenty eight ancestry informative SNPs, *Am. J. Hum. Biol.* 22 (2010) 187–192, <http://dx.doi.org/10.1002/ajhb.20976>.
- [24] J.R.M. Oliveira, A.L. Nishimura, R.R. Lemos, M. Zatz, The genetics of Alzheimer's disease in Brazil: 10 years of analysis in a unique population, *J. Mol. Neurosci.* 37 (2009) 74–79, <http://dx.doi.org/10.1007/s12031-008-9124-0>.
- [25] C. Capurso, Has dysregulated interleukin-6 gene a role in the development of Alzheimer's disease? *Neurosci. Lett.* 504 (2011) 1–3, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2011.08.038>.
- [26] M. Hüll, S. Strauss, M. Berger, B. Volk, J. Bauer, The participation of interleukin-6, a stress-inducible cytokine, in the pathogenesis of Alzheimer's disease, *Behav. Brain Res.* 78 (1996) 37–41, [http://dx.doi.org/10.1016/0166-4328\(95\)00213-8](http://dx.doi.org/10.1016/0166-4328(95)00213-8).
- [27] E.T. Keller, J. Wanagat, W.B. Ershler, Molecular and cellular biology of interleukin-6 and its receptor, *Front. Biosci.* 1 (1996) d340–d357.
- [28] C. Capurso, V. Solfrizzi, A.M. Colacicco, A. D'Introno, V. Frisardi, B.P. Imbimbo, et al., Interleukin 6-174 G/C promoter and variable number of tandem repeats (VNTR) gene polymorphisms in sporadic Alzheimer's disease, *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 34 (2010) 177–182, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpb.2009.10.022>.
- [29] E. Cousin, S. Macé, C. Rocher, C. Dib, G. Muzard, D. Hannequin, et al., No replication of genetic association between candidate polymorphisms and Alzheimer's disease, *Neurobiol. Aging* 32 (2011) 1443–1451, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2009.09.004>.
- [30] C. Depboylu, F. Lohmüller, P. Gocke, Y. Du, R. Zimmer, T. Gasser, et al., An interleukin-6 promoter variant is not associated with an increased risk for Alzheimer's disease, *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 17 (2004) 170–173, <http://dx.doi.org/10.1159/000076352>.
- [31] V. Giedraitis, L. Kilander, M. Degerman-Gunnarsson, J. Sundelöf, T. Axelsson, A.C. Sjövänen, et al., Genetic analysis of Alzheimer's disease in the Uppsala Longitudinal Study of Adult Men, *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 27 (2009) 59–68, <http://dx.doi.org/10.1159/000191203>.
- [32] B. Paradowski, D. Celczyńska, T. Dobosz, L. Noga, Polymorphism 174 G/C of interleukin 6 gene in Alzheimer's disease—preliminary report, *Neurol. Neurochir. Pol.* 42 (2008) 312–315.
- [33] G. Ravaglia, F. Paola, F. Maioli, M. Martelli, F. Montesi, L. Bastagli, et al., Interleukin-1beta and interleukin-6 gene polymorphisms as risk factors for AD: a prospective study, *Exp. Gerontol.* 41 (2006) 85–92, <http://dx.doi.org/10.1016/j.exger.2005.10.005>.
- [34] Y. Zhang, A. Hayes, A. Pritchard, U. Thaker, M.S. Haque, H. Lemmon, et al., Interleukin-6 promoter polymorphism: risk and pathology of Alzheimer's disease, *Neurosci. Lett.* 362 (2004) 99–102, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2004.03.008>.
- [35] L. Rasmussen, R. Delabio, L. Horiguchi, I. Mizumoto, C.R. Terazaki, D. Mazzotti, et al., Association between interleukin 6 gene haplotype and Alzheimer's disease: a Brazilian case-control study, *J. Alzheimer's Dis.* 36 (2013) 733–738, <http://dx.doi.org/10.3233/JAD-122407>.
- [36] N. Mansoori, M. Tripathi, K. Luthra, R. Alam, R. Lakshmy, S. Sharma, et al., MTHFR (677 and 1298) and IL-6-174 G/C genes in pathogenesis of Alzheimer's and vascular dementia and their epistatic interaction, *Neurobiol. Aging* 33 (2012) 1003.e1–1003.e8, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.09.018>.
- [37] X. Qin, Y. Li, H. Yuan, D. Xie, G. Tang, B. Wang, et al., Relationship of MTHFR gene 677C→T polymorphism, homocysteine, and estimated glomerular filtration rate levels with the risk of new-onset diabetes, *Med. (Baltimore)* 94 (2015), <http://dx.doi.org/10.1097/MD.0000000000000563>, e563.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho teve como objetivo investigar a criação de um possível perfil de biomarcadores genéticos para a Doença de Alzheimer Esporádica em uma amostra de pacientes e controles na população da Grande Vitória-ES.

Para se estudar esse perfil de biomarcadores genéticos, foi averiguado primeiramente se os SNPs rs3764650 *ABCA7*, rs744373 *BIN1*, rs6656401 *CR1*, rs610932 *MS4A6A*, rs3865444 *CD33* e rs1800795 *IL-6* estão associados com DAE na população da Grande Vitória de forma isolada. A primeira hipótese foi que os SNPs rs3764650 *ABCA7*, rs744373 *BIN1*, rs6656401 *CR1*, rs610932 *MS4A6A*, rs3865444 *CD33* e rs1800795 *IL-6* estão associados para DAE na população da Grande Vitória-ES. A hipótese não é totalmente rejeitada uma vez que os resultados sugerem que apenas o rs3865444 no gene *CD33* está associado com DAE como fator de proteção.

Por conseguinte, a segunda hipótese foi que os SNPs da via inflamatória (rs3764650 *ABCA7*, rs610932 *MS4A6A*, rs3865444 *CD33*, rs6656401 *CR1*, rs1800795 *IL-6* e rs1136000 *CLU*) e da via do metabolismo, tráfego e endocitose de lipídios (rs744373 *BIN1*, rs429358 e rs7412 *APOE*, rs3764650 *ABCA7* e rs1136000 *CLU*) interagem em pares em epistasia para associação para a DAE. No entanto, os SNPs em *CD33* e o *IL-6* foram removidos da análise uma vez que estavam fora do Equilíbrio de Hardy-Weinberg. A segunda hipótese também não é totalmente rejeitada uma vez que os resultados sugerem interação em pares de epistasia entre os SNPs no gene *APOE* com *BIN1* e *APOE* com *CLU* para DAE como fator de risco.

A criação de um perfil de biomarcadores genéticos para DAE não foi possível uma vez que obteve-se apenas uma associação para fator de proteção e duas epistasias de risco para DAE. Seria necessário um número maior de associações para se criar o painel de biomarcadores genéticos. Mesmo assim, o trabalho é importante uma vez que dará abertura para mais estudos de associação que pretendam contribuir para a formação de um perfil de biomarcadores genéticos na Grande Vitória-ES.

O presente trabalho reconhece algumas limitações metodológicas. Primeiramente, para se criar um painel de biomarcadores genéticos, haveria a necessidade de um número amostral grande. O número amostral utilizado foi pequeno se comparado com outros estudos de caso-controle em estudos de associação. Devido ao número amostral pequeno, não foi possível realizar análises de epistasia com mais de duas variáveis, pois poderia reduzir o poder estatístico nas análises e gerar resultados falso-positivos. Além disso, haveria a necessidade de se escolher um grande número de variáveis para serem analisadas para a criação do painel de biomarcadores. E ainda, as variantes genéticas selecionadas com base em estudos de GWAS e importância nas vias para DA estão, em sua maioria, em regiões não codificantes. Com isso, a chance de se obter resultados falsos-positivos aumenta. Isto porque esses SNPs podem ser fatores de risco ou proteção mas estarem na verdade associados indiretamente com SNPs em regiões codificantes dos genes, que são as variantes que causariam o risco real para DAE.

Contudo, o trabalho tem importância uma vez que na população Brasileira, não há estudos de associação das variáveis rs744373 *BIN1*, rs3764650 *ABCA7*, rs6656401 *CR1*, rs3865444 *CD33* e rs610932 *MS4A6A*. As variantes reportadas por GWAS necessitam de serem validadas em estudos de caso-controle em diversas populações pois cada uma tem um perfil genético característico. Além disso, o trabalho pretendeu contribuir com os estudos de biomarcadores na tentativa de se criar um perfil de biomarcadores genéticos para auxiliar no melhoramento de um diagnóstico com maior precisão para pacientes de DA na fase pré-clínica. E também almejou contribuir no entendimento da etiologia da DA para com que se possa desenvolver novos tratamentos eficazes para a doença.

7. REFERÊNCIAS

AGAMANOLIS, D. **Alzheimer's disease**. Disponível em: <<http://neuropathology-web.org/chapter9/chapter9bAD.html>>. Acesso em: 7 dec. 2016.

AGRAWAL, M.; BISWAS, A. Molecular diagnostics of neurodegenerative disorders. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 2, n. September, p. 54, 2015.

AIYAZ, M. et al. Complement activation as a biomarker for Alzheimer's disease. **Immunobiology**, v. 217, n. 2, p. 204–215, 2012.

ALLEN, M. et al. Association and heterogeneity at the GAPDH locus in Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging**, v. 33, n. 1, p. 203–25, 2012.

ALMADA, B. V. P. et al. Protective effect of the APOE-e3 allele in Alzheimer's disease. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 45, n. 1, p. 8–12, Jan. 2012.

ALMEIDA, O. P. MINI EXAME DO ESTADO MENTAL E O DIAGNÓSTICO DE DEMÊNCIA NO BRASIL. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 56, n. February, p. 605–612, 1998.

ALZHEIMER'S ASSOCIATION. 2015 Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association**, v. 11, n. 3, p. 332–84, 2015.

ALZHEIMER, A. Uber eigenartige Krankheitsfalle des spateren Alters: (On certain peculiar diseases of old age. **History of Psychiatry**, v. 2, n. 5, p. 74–101, 1 Mar. 1991.

APOSTOLOVA, L. G. et al. Conversion of mild cognitive impairment to Alzheimer disease predicted by hippocampal atrophy maps. **Archives of neurology**, v. 63, n. 5, p. 693–9, 2006.

ASSOCIATION, A. 2015 Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimer's and Dementia**, v. 11, n. 3, p. 332–384, 2015.

ASSOCIATION, A. Alzheimer's Disease Facts and Figures. **Alzheimer's & Dementia**, v. 12, n. 4, 2016.

ATKINSON A.J., J. et al. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 69, n. 3, p. 89–95, 2001.

AVRAMOPOULOS, D. Genetics of Alzheimer's disease: recent advances. **Genome medicine**, v. 1, n. 3, p. 34, 27 Mar. 2009.

BARKHOF, F. et al. **Neuroimaging in Dementia**. 1. ed. London: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011.

BEERI, M. S. et al. The effects of cardiovascular risk factors on cognitive

compromise. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 11, n. 2, p. 201–212, 2009.

BELCAVELLO, L. et al. Association of MTHFR and PICALM polymorphisms with Alzheimers disease. **Molecular Biology Reports**, v. 42, n. 3, p. 611–616, 2015.

BERTRAM, L. et al. Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. **Nature genetics**, v. 39, n. 1, p. 17–23, 2007.

BERTRAM, L.; LILL, C. M.; TANZI, R. E. The Genetics of Alzheimer Disease: Back to the Future. **Neuron**, v. 68, p. 270–281, 2010.

BHATTACHARJEE, S.; ZHAO, Y.; LUKIW, W. J. Deficits in the miRNA-34a-regulated endogenous TREM2 phagocytosis sensor-receptor in Alzheimer's disease (AD); an update. **Frontiers in aging neuroscience**, v. 6, p. 116, 2014.

BOLLER, F.; FORBES, M. M. History of dementia and dementia in history: an overview. **Journal of the neurological sciences**, v. 158, n. 2, p. 125–33, 30 Jun. 1998.

BRAAK, H.; BRAAK, E. Neuropathological Staging of Alzheimer-Related Changes. **Acta Neuropathologica**, v. 82, n. 4, p. 239–259, 1991.

BRION, J. P. Neurofibrillary tangles and Alzheimer's disease. **European Neurology**, v. 40, n. 3, p. 130–140, 1998.

BRUNDEN, K. R.; TROJANOWSKI, J. Q.; LEE, V. M.-Y. Advances in tau-focused drug discovery for Alzheimer's disease and related tauopathies. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, n. 10, p. 783–793, Oct. 2009.

BUERGER, K. et al. CSF phosphorylated tau protein correlates with neocortical neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. **Brain**, v. 129, n. 11, p. 3035–3041, 2006.

BUERGER, K. et al. No correlation between CSF tau protein phosphorylated at threonine 181 with neocortical neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. **Brain**, v. 130, n. 10, p. e82–e82, 1 Oct. 2007.

BUSH, W. S.; MOORE, J. H. Chapter 11: Genome-Wide Association Studies. **Plos One**, v. 8, n. 12, 2012.

CAI, X. D.; GOLDE, T. E.; YOUNKIN, S. G. Release of excess amyloid beta protein from a mutant amyloid beta protein precursor. **Science (New York, N.Y.)**, v. 259, n. 5094, p. 514–6, 22 Jan. 1993.

CAIXETA, L. Epidemiologia da doença de Alzheimer. In: ARTMED (Ed.). **Doença de Alzheimer**. Porto Alegre: [s.n.].

CAMPOREZ, D. **ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES MTHFR, PICALM, EPHA1, ECA e Cat-D NA DOENÇA DE ALZHEIMER**. [s.l.]

Universidade Federal do Espírito Santo, 2014.

CASCORBI, I. et al. Association of ATP-binding cassette transporter variants with the risk of Alzheimer's disease. **Pharmacogenomics**, v. 14, n. 5, p. 485–494, 2013.

CASTELLANI, R.; ROLSTON, R.; SMITH, M. Alzheimer Disease. **Disease-a-Month**, v. 56, n. 9, p. 1–60, 2011.

CAVEDO, E. et al. The road ahead to cure Alzheimer's disease: development of biological markers and neuroimaging methods for prevention trials across all stages and target populations. **The journal of prevention of Alzheimer's disease**, v. 1, n. 3, p. 181, 2014.

CELONE, K. A et al. Alterations in Memory Networks in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease: An Independent Component Analysis. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 40, p. 10222–10231, 2006.

CHAN, S. L. et al. ATP-binding cassette transporter A7 regulates processing of amyloid precursor protein in vitro. **Journal of Neurochemistry**, v. 106, n. 2, p. 793–804, 2008.

CHAPUIS, J. et al. Increased expression of BIN1 mediates Alzheimer genetic risk by modulating tau pathology. **Molecular psychiatry**, v. 18, n. 11, p. 1225–34, 2013.

CHIBNIK, L. B. et al. CR1 is associated with amyloid plaque burden and age-related cognitive decline. v. 69, n. 3, p. 560–569, 2011.

CHRISTEN, Y. Oxidative stress and Alzheimer disease. **The American journal of clinical nutrition**, v. 71, n. 2, p. 621S–629S, 2000.

CITRON, M. et al. Mutation of the β -amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases β -protein production. **Nature**, v. 360, n. 6405, p. 672–674, 17 Dec. 1992.

COMBARROS, O. et al. Replication by the Epistasis Project of the interaction between the genes for IL-6 and IL-10 in the risk of Alzheimer's disease. **Journal of neuroinflammation**, v. 6, p. 22, 2009a.

COMBARROS, O. et al. Epistasis in sporadic Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 30, n. 9, p. 1333–1349, 2009b.

CORTINA-BORJA, M. et al. The synergy factor: a statistic to measure interactions in complex diseases. **BioMed Central research notes**, v. 2, n. 1, p. 105, 2009.

CREHAN, H. et al. Complement receptor 1 (CR1) and Alzheimer's disease. **Immunobiology**, v. 217, n. 2, p. 244–250, 2012.

CROCKER, P. R.; PAULSON, J. C.; VARKI, A. Siglecs and their roles in the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 4, p. 255–266, Apr. 2007.

DARAWI, M. N. et al. Allele-specific polymerase chain reaction for the detection of Alzheimer's disease-related single nucleotide polymorphisms. **BioMed Central medical genetics**, v. 14, n. 1, p. 27, 2013.

DELRIEU, J. et al. Managing cognitive dysfunction through the continuum of alzheimer's disease: Role of pharmacotherapy. **CNS Drugs**, v. 25, n. 3, p. 213–226, 2011.

DENK, J. et al. MicroRNA Profiling of CSF Reveals Potential Biomarkers to Detect Alzheimer's Disease. **Plos One**, v. 10, n. 5, p. e0126423, 2015.

DONG, H. K. et al. Integrated late onset Alzheimer's disease (LOAD) susceptibility genes: Cholesterol metabolism and trafficking perspectives. **Gene**, v. 597, p. 10–16, Jan. 2017.

EBBERT, M. T. W.; RIDGE, P. G.; KAUWE, J. S. K. Bridging the Gap between Statistical and Biological Epistasis in Alzheimer's Disease. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–7, 2015.

EL GAAMOUCHE, F. et al. Alzheimer's Disease Risk Genes and Lipid Regulators. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 53, n. 1, p. 15–29, 22 Jun. 2016.

ENGELBORGH, S. et al. No association of CSF biomarkers with APOE ϵ 4, plaque and tangle burden in definite Alzheimer's disease. **Brain**, v. 130, n. 9, p. 2320–2326, 2007.

ESQUIROL, J. E. D. **Des maladies mentales**. Paris: J. B. Baillière, 1838.

EWERS, M. et al. Increased CSF-BACE 1 activity is associated with ApoE-4 genotype in subjects with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. **Brain**, v. 131, n. 5, p. 1252–1258, 2007.

FOLSTEIN, M. F.; FOLSTEIN, S. E.; MCHUGH, P. R. "Mini-mental state": A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. **Journal of psychiatric research**, v. 12, n. 3, p. 189–98, Nov. 1975.

FROTA, N. A. F. et al. Critérios para o diagnóstico de doença de Alzheimer. **Dementia e Neuropsychologia**, v. 5, n. Suppl 1, p. 5–10, 2011.

GALIMBERTI, D. et al. Circulating miRNAs as potential biomarkers in Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's disease : JAD**, v. 42, n. 4, p. 1261–7, 2014.

GEORGE. Piecing together Alzheimer's. **Scientific American**, v. 283, n. 6, p. 52, 2000.

GRICIUC, A. et al. Alzheimer's Disease Risk Gene CD33 Inhibits Microglial Uptake of Amyloid Beta. **Neuron**, v. 78, n. 4, p. 631–643, 2014.

HARDY, J. The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. **Science**, v. 297, n. 5580, p. 353–356, 19 Jul. 2002.

HARDY, J. A.; HIGGINS, G. A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. **Science (New York, N.Y.)**, v. 256, n. 5054, p. 184–5, 10 Apr. 1992.

HAROLD, D. et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease, and shows evidence for additional susceptibility genes. **Nature genetics**, v. 41, n. 10, p. 1088–1093, 2009.

HARR, S. D. et al. Brain expression of apolipoproteins E, J, and A-I in Alzheimer's disease. **Journal of neurochemistry**, v. 66, n. 6, p. 2429–2435, 1996.

HENEKA, M. T. et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. **The Lancet Neurology**, v. 14, n. 4, p. 388–405, 2015.

HEPPNER, F. L.; RANSOHOFF, R. M.; BECHER, B. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, n. 6, p. 358–372, 20 May 2015.

HICKMAN, R. A.; FAUSTIN, A.; WISNIEWSKI, T. Alzheimer Disease and Its Growing Epidemic. **Neurologic Clinics**, p. 1–13, 2016.

HIPPIUS, H.; NEUNDÖRFER, G. The discovery of Alzheimer's disease. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 5, n. 1, p. 101–108, 2003.

HOLLINGWORTH, P. et al. Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. **Nature genetics**, v. 43, n. 5, p. 429–435, 2011a.

HOLLINGWORTH, P. et al. Alzheimer's disease genetics: current knowledge and future challenges. **International Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 26, n. 8, p. 793–802, Aug. 2011b.

HOLTZMAN, D. M.; MORRIS, J. C.; GOATE, A. M. Alzheimer's disease: the challenge of the second century. **Science translational medicine**, v. 3, n. 77, p. 77sr1, 6 Apr. 2011.

HOSOKAWA, M. et al. Expression of complement messenger RNAs and proteins by human oligodendroglial cells. **GLIA**, v. 42, n. 4, p. 417–423, 2003.

HUELL, M. et al. Interleukin-6 is present in early stages of plaque formation and is restricted to the brains of Alzheimer's disease patients. **Acta neuropathologica**, v. 89, n. 6, p. 544–51, 1995.

JANDUS, C.; SIMON, H.-U.; VON GUNTEN, S. Targeting Siglecs - A novel pharmacological strategy for immuno- and glycotherapy. **Biochemical Pharmacology**, v. 82, n. 4, p. 323–332, 2011.

JARRETT, J. T.; BERGER, E. P.; LANSBURY, P. T. The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Biochemistry**, v. 32, n. 18, p. 4693–7, 11

May 1993.

JIANG, T. et al. CD33 in alzheimer's disease. **Molecular Neurobiology**, v. 49, n. 1, p. 529–535, 2014.

JONES, S. E.; JOMARY, C. Clusterin. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 34, n. 5, p. 427–431, 2002.

KARCH, C. M. et al. Expression of Novel Alzheimer's Disease Risk Genes in Control and Alzheimer's Disease Brains. **Plos One**, v. 7, n. 11, 2012.

KARCH, C. M.; GOATE, A. M. Alzheimer's Disease Risk Genes and Mechanisms of Disease Pathogenesis. **Biological Psychiatry**, p. 1–9, 2014.

KELLER, E. T.; WANAGAT, J.; ERSHLER, W. B. Molecular and cellular biology of interleukin-6 and its receptor. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 1, n. 1, p. d340–d357, 1996.

KIM, W. S. et al. Deletion of Abca7 increases cerebral amyloid- β accumulation in the J20 mouse model of Alzheimer's disease. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 33, n. 10, p. 4387–94, 2013.

KIM, W. S.; WEICKERT, C. S.; GARNER, B. Role of ATP-binding cassette transporters in brain lipid transport and neurological disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 104, n. 5, p. 1145–1166, 2008.

KIRSZBAUM, L.; BOZAS, S. E.; WALKER, I. D. SP-40,40, a protein involved in the control of the complement pathway, possesses a unique array of disulphide bridges. **Federation of European Biochemical Societies letters**, v. 297, n. 1–2, p. 70–6, 3 Feb. 1992.

KLIMKOWICZ-MROWIEC, A. et al. Lack of association of CR1 , PICALM and CLU gene polymorphisms with Alzheimer disease in a Polish population. **Polish Journal of Neurology and Neurosurgery**, p. 157–160, 2013.

KOJRO, E. et al. Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the γ -secretase ADAM 10. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 10, p. 5815–5820, 8 May 2001.

KONG, Y. et al. Polymorphism of the OLR1 3'UTR potential microRNA binding site and risk of Alzheimer's disease: a meta-analysis. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 4, p. 10162–10172, 4 Dec. 2014.

LADU, M. J. et al. Isoform-specific binding of apolipoprotein E to beta-amyloid. **The Journal of biological chemistry**, v. 269, n. 38, p. 23403–6, 23 Sep. 1994.

LAMBERT, J.-C. et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. **Nature genetics**, v. 41, n. 10, p. 1094–9, Oct. 2009.

LAMBERT, J. C.; AMOUYEL, P. Genetics of Alzheimer's disease: New evidences for an old hypothesis? **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 21, n. 3, p. 295–301, 2011.

LANGBAUM, J. B. et al. Ushering in the study and treatment of preclinical Alzheimer disease. **Nature reviews. Neurology**, v. 9, n. 7, p. 371–81, 2013.

LEE, C. Y. D.; LANDRETH, G. E. The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain. **Journal of Neural Transmission**, v. 117, n. 8, p. 949–960, 2010.

LEIBING, A. **Doença de Alzheimer: (Um) a História**. Disponível em: <http://www.academia.edu/270900/Doença_De_Alzheimer_Um_a_História_Alzheimers_Disease_a_History>. Acesso em: 4 dec. 2016.

LI, C. et al. Astrocytes: implications for neuroinflammatory pathogenesis of Alzheimer's disease. **Current Alzheimer research**, v. 8, n. 1, p. 67–80, 2011a.

LI, H.-L. et al. PICALM and CR1 variants are not associated with sporadic Alzheimer's disease in Chinese patients. **Journal of Alzheimer's disease : JAD**, v. 25, n. 1, p. 111–7, 2011b.

LIANG, Y. et al. Structural organization of the human MS4A gene cluster on Chromosome 11q12. **Immunogenetics**, v. 53, n. 5, p. 357–68, Jul. 2001.

LIANG, Y.; TEDDER, T. F. Identification of a CD20-, Fc ϵ RI β -, and HTm4-Related Gene Family: Sixteen New MS4A Family Members Expressed in Human and Mouse. **Genomics**, v. 72, n. 2, p. 119–127, 2001.

LICASTRO, F. et al. Interleukin-6 gene alleles affect the risk of Alzheimer's disease and levels of the cytokine in blood and brain. **Neurobiology of Aging**, v. 24, n. 7, p. 921–926, 2003.

LISTA, S. et al. Biomarkers in Sporadic and Familial Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's disease : JAD**, v. 47, n. 2, p. 291–317, 2015.

LONG, J. M.; RAY, B.; LAHIRI, D. K. MicroRNA-153 Physiologically Inhibits Expression of Amyloid- Precursor Protein in Cultured Human Fetal Brain Cells and Is Dysregulated in a Subset of Alzheimer Disease Patients. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 37, p. 31298–31310, 7 Sep. 2012.

LUTZ, M. W. et al. A genetics-based biomarker risk algorithm for predicting risk of Alzheimer's disease. **Alzheimer's and Dementia: Translational Research and Clinical Interventions**, v. 2, n. 1, p. 30–44, 2016.

MA, J. et al. MS4A6A genotypes are associated with the atrophy rates of Alzheimer's disease related brain structures. **Oncotarget**, v. 7, n. 37, 2014a.

MA, S. L.; LAM, L. C. W. Panel of genetic variations as a potential non-invasive biomarker for early diagnosis of Alzheimer's disease. **Clinical Psychopharmacology and Neuroscience**, v. 9, n. 2, p. 54–66, 2011.

- MA, X.-Y. et al. Missense variants in CR1 are associated with increased risk of Alzheimer's disease in Han Chinese. **Neurobiology of aging**, v. 35, n. 2, p. 443.e17-21, Feb. 2014b.
- MACCIONI, R. B. et al. The role of neuroimmunomodulation in Alzheimer's disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1153, p. 240–246, 2009.
- MAHMOUDI, R. et al. Alzheimer's disease is associated with low density of the long CR1 isoform. **Neurobiology of aging**, v. 36, n. 4, p. 1766.e5-12, Apr. 2015.
- MARTISKAINEN, H. et al. Transcriptomics and mechanistic elucidation of Alzheimer's disease risk genes in the brain and in vitro models. **Neurobiology of Aging**, v. 36, n. 2, p. 1221.e15-1221.e28, Feb. 2015.
- MASTERS, C. L. et al. Alzheimer's disease. **The Lancet**, v. 6736, n. 15, p. 1–13, 2016.
- MATSUBARA, E. et al. Apolipoprotein J and Alzheimer's amyloid beta solubility. **The Biochemical journal**, v. 316, p. 671–9, 1996.
- MATTSON, M. P.; KELLER, J. N.; BEGLEY, J. G. Evidence for synaptic apoptosis. **Experimental neurology**, v. 153, n. 1, p. 35–48, 1998.
- MAURER, K.; VOLK, S.; GERBALDO, H. Auguste D and Alzheimer's disease. **Lancet**, v. 349, n. 9064, p. 1546–1549, 1997.
- MAWUENYEGA, K. G. et al. Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. **Science (New York, N.Y.)**, v. 330, n. 6012, p. 1774, 2010.
- MCCLEAN, P. L. et al. The diabetes drug liraglutide prevents degenerative processes in a mouse model of Alzheimer's disease. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 31, n. 17, p. 6587–6594, 2011.
- MCGEER, E. G.; MCGEER, P. L. Inflammatory Cytokines in the CNS. **CNS Drugs**, v. 7, n. 3, p. 214–228, Mar. 1997.
- MCKHANN, G. et al. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. **Neurology**, v. 34, n. 7, p. 939–44, Jul. 1984.
- MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic acids research**, v. 16, n. 3, p. 1215, 11 Feb. 1988.
- MOORE, J. H.; WILLIAMS, S. M. Traversing the conceptual divide between biological and statistical epistasis: Systems biology and a more modern synthesis. **BioEssays**, v. 27, n. 6, p. 637–646, 2005.

MORGAN, K.; CARRASQUILLO, M. M. **Genetic Variants in Alzheimer's Disease**. 1. ed. New York: Springer-Verlag New York, 2013. v. 53

MUNGAS, D. et al. Longitudinal volumetric MRI change and rate of cognitive decline. **Neurology**, v. 65, n. 4, p. 565–571, 2005.

NAJ, A. C. et al. Common variants in MS4A4/MS4A6E, CD2uAP, CD33, and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease Adam. **Nature genetics**, v. 43, n. 5, p. 436–441, 2011.

NEFF, M. M.; TURK, E.; KALISHMAN, M. Web-based primer design for single nucleotide polymorphism analysis. **Trends in Genetics**, v. 18, n. 12, p. 613–615, 2002.

NIRANJAN, R. Molecular basis of etiological implications in alzheimer's disease: Focus on neuroinflammation. **Molecular Neurobiology**, v. 48, n. 3, p. 412–428, 2013.

NITRINI, R. et al. Incidence of dementia in a community-dwelling Brazilian population. **Alzheimer disease and associated disorders**, v. 18, n. 4, p. 241–6, 2004.

NOTKOLA, I. L. et al. Serum total cholesterol, apolipoprotein E epsilon 4 allele, and Alzheimer's disease. **Neuroepidemiology**, v. 17, n. 1, p. 14–20, 1998.

NUSSBAUM, R. L. et al. **Thompson & Thompson; Thompson genetics in medicine**. 8. ed. [s.l.] Elsevier, 2016.

NUSSBAUM, R. L.; ELLIS, C. E. Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 14, 2003.

O'BRIEN, R. J.; WONG, P. C.; EDU, R. Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer's Disease. **Annual Review of Neuroscience**, v. 34, p. 185–204, 2011.

OHARA, T. et al. Association study of susceptibility genes for late-onset Alzheimer's disease in the Japanese population. **Psychiatric Genetics**, v. 22, n. 6, p. 290–293, 2012.

OLOMOLAIYE, O.; WOOD, N. A. P.; BIDWELL, J. L. A novel NlaIII polymorphism in the human IL-6 promoter. **European Journal of Immunogenetics**, v. 25, n. 2–3, p. 267–267, Apr. 1998.

OMOUMI, A. et al. Neurobiology of Aging Evaluation of late-onset Alzheimer disease genetic susceptibility risks in a Canadian population. **Neurobiology of Aging**, v. 35, n. 4, p. 936.e5-936.e12, 2014.

OSKOWSKI, P. et al. Direct and potent regulation of gamma-secretase by its lipid microenvironment. **The Journal of biological chemistry**, v. 283, n. 33, p. 22529–40, 15 Aug. 2008.

PANT, S. et al. AMPH-1/Amphiphysin/Bin1 functions with RME-1/Ehd1 in endocytic

recycling. **Nature cell biology**, v. 11, n. 12, p. 1399–410, 2009.

PAOLO, G. DI; KIM, T. Linking Lipids to Alzheimer ' s Disease : Cholesterol and Beyond. **Aging**, v. 12, n. 5, p. 284–296, 2012.

PASTERNAK, J. J. **Uma Introdução à Genética Molecular Humana: Mecanismos das Doenças Hereditárias**. 2. ed. [s.l.: s.n.].

PFRIEGER, F. W. Cholesterol homeostasis and function in neurons of the central nervous system. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 60, n. 6, p. 1158–71, 2003.

POSTINA, R. A closer look at alpha-secretase. **Current Alzheimer research**, v. 5, n. 2, p. 179–86, Apr. 2008.

PRINCE, M. et al. World Alzheimer Report 2015: The Global Impact of Dementia - An analysis of prevalence, incidence, cost and trends. **Alzheimer's Disease International**, p. 84, 2015.

PRINCE, M. et al. **World Alzheimer Report 2016: Improving healthcare for people living with dementia**. London: Alzheimer's Disease International (ADI), 2016.

RAMIREZ, L. M. et al. Common variants in ABCA7 and MS4A6A are associated with cortical and hippocampal atrophy. **Neurobiology of Aging**, v. 39, p. 82–89, 2016.

RANSOHOFF, R. M.; PERRY, V. H. Microglial Physiology: Unique Stimuli, Specialized Responses. **Annual Review of Immunology**, v. 27, n. 1, p. 119–145, Apr. 2009.

RASKIN, J. et al. Neurobiology of Alzheimer's Disease: Integrated Molecular, Physiological, Anatomical, Biomarker, and Cognitive Dimensions. **Current Alzheimer research**, v. 12, n. 8, p. 712–22, 2015.

REITZ, C. Dyslipidemia and the risk of Alzheimer's disease. **Current atherosclerosis reports**, v. 15, n. 3, p. 307, 2013.

REITZ, C.; MAYEUX, R. Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. **Biochemical Pharmacology**, v. 88, n. 4, p. 640–651, 2014.

REMBACH, A. Alzheimer disease: The search for a blood-based biomarker for Alzheimer disease. **Nature Reviews Neurology**, v. 10, n. 11, p. 618–619, 30 Sep. 2014.

REN, G. et al. The BAR domain proteins: molding membranes in fission, fusion, and phagy. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 70, n. 1, p. 37–120, Mar. 2006.

RIZZI, F. et al. Clusterin is a short half-life, poly-ubiquitinated protein, which controls the fate of prostate cancer cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 219, n. 2, p. 314–323, 2009.

- ROBERT, R.; WARK, K. L. Engineered antibody approaches for Alzheimer's disease immunotherapy. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 526, n. 2, p. 132–138, 2012.
- RODRIGUEZ, S.; GAUNT, T. R.; DAY, I. N. M. Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studies. **American journal of epidemiology**, v. 169, n. 4, p. 505–14, 15 Feb. 2009.
- ROGERS, J. et al. Complement activation by f8-amyloid in Alzheimer disease. **Physiology**, v. 89, p. 10016–10020, 1992.
- ROGERS, J. et al. Peripheral clearance of amyloid beta peptide by complement C3-dependent adherence to erythrocytes. **Neurobiology of aging**, v. 27, n. 12, p. 1733–9, Dec. 2006.
- ROZEN, S.; SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 132, p. 365–86, 2000.
- SAKAE, N. et al. ABCA7 Deficiency Accelerates Amyloid- Generation and Alzheimer's Neuronal Pathology. **Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 13, p. 3848–3859, 2016.
- SALMINEN, A.; KAARNIRANTA, K. Siglec receptors and hiding plaques in Alzheimer's disease. **Journal of Molecular Medicine**, v. 87, n. 7, p. 697–701, 2009.
- SCHMIDT, C. et al. Alzheimer's disease: Genetic polymorphisms and rate of decline. **Dementia and Geriatric Cognitive Disorders**, v. 33, n. 2–3, p. 84–89, 2012.
- SCHRIJVERS, E. M. C. et al. Plasma clusterin and the risk of Alzheimer disease. **JAMA : the journal of the American Medical Association**, v. 305, n. 13, p. 1322–1326, 2011.
- SCHÜRMAN, B. et al. Association of the Alzheimer's disease clusterin risk allele with plasma clusterin concentration. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 25, n. 3, p. 421–424, 2011.
- SERPENTE, M. et al. Innate immune system and inflammation in Alzheimer's disease: From pathogenesis to treatment. **NeuroImmunoModulation**, v. 21, n. 2–3, p. 79–87, 2014.
- SHEN, Y.; MERI, S. Yin and Yang: complement activation and regulation in Alzheimer's disease. **Progress in neurobiology**, v. 70, n. 6, p. 463–72, Aug. 2003.
- SHOBAB, L. A.; HSIUNG, G.-Y. R.; FELDMAN, H. H. Cholesterol in Alzheimer's disease. **The Lancet Neurology**, v. 4, n. 12, p. 841–852, Dec. 2005.
- SHULMAN, J. M. et al. Genetic Susceptibility for Alzheimer's Disease Neuritic Plaque Pathology. **Journal of the American Medical Association Neurology**, v. 70, n. 9, p. 1150–1157, 2013.

SING, C. F.; DAVIGNON, J. Role of the apolipoprotein E polymorphism in determining normal plasma lipid and lipoprotein variation. **American journal of human genetics**, v. 37, n. 2, p. 268–85, Mar. 1985.

SPERLING, R. Potential of functional MRI as a biomarker in early Alzheimer's disease. **Neurobiology of aging**, v. 32 Suppl 1, n. Suppl 1, p. S37-43, 2011.

STRITTMATTER, W. J. et al. Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 17, p. 8098–102, 1993.

SUH, Y.-H.; CHECLER, F. Amyloid precursor protein, presenilins, and alpha-synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. **Pharmacological reviews**, v. 54, n. 3, p. 469–525, 2002.

SUZUKI, N. et al. An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. **Science (New York, N.Y.)**, v. 264, n. 5163, p. 1336–40, 27 May 1994.

TAN, L. et al. Association of GWAS-linked loci with late-onset Alzheimer's disease in a northern Han Chinese population. **Alzheimer's and Dementia**, v. 9, n. 5, p. 546–553, 2013.

TAN, M. S.; YU, J. T.; TAN, L. Bridging integrator 1 (BIN1): Form, function, and Alzheimer's disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 19, n. 10, p. 594–603, 2013.

TECHNOLOGIES, L. **TaqMan® SNP Genotyping Assays**. [s.l: s.n.].

TERRY, R. D. et al. Some morphometric aspects of the brain in senile dementia of the alzheimer type. **Annals of Neurology**, v. 10, n. 2, p. 184–192, 1981.

THEUNS, J. et al. Genetic variability in the regulatory region of presenilin 1 associated with risk for Alzheimer's disease and variable expression. **Human molecular genetics**, v. 9, n. 3, p. 325–31, 2000.

THOMAS, P.; FENECH, M. A review of genome mutation and Alzheimer's disease. **Mutagenesis**, v. 22, n. 1, p. 15–33, 2007.

THOMPSON, P. M.; VINTERS, H. V. Pathologic lesions in neurodegenerative diseases. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 107, p. 1–40, 2012.

TOKUDA, T. et al. Lipidation of apolipoprotein E influences its isoform-specific interaction with Alzheimer's amyloid β peptides. **Biochemical Journal**, v. 348, n. 2, p. 359–365, 2000.

TORRES, K. C. DE L. et al. Biomarkers in Alzheimer disease. **Geriatr Gerontol Aging**, v. 6, n. 3, p. 273–282, 2012.

VASILIOU, V.; VASILIOU, K.; NEBERT, D. W. Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. v. 3, n. 3, p. 281–290, 2009.

VERRI, M. et al. Mitochondrial alterations, oxidative stress and neuroinflammation in Alzheimer's disease. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 25, n. 2, p. 345–353, 2012.

VILLEGAS-LLERENA, C. et al. Microglial genes regulating neuroinflammation in the progression of Alzheimer's disease. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 36, p. 74–81, Feb. 2016.

VIMR, E. et al. To sialylate, or not to sialylate: that is the question. **Trends in microbiology**, v. 10, n. 6, p. 254–7, Jun. 2002.

VINCZE, T.; POSFAI, J.; ROBERTS, R. J. NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes. **Nucleic acids research**, v. 31, n. 13, p. 3688–91, 1 Jul. 2003.

VINTERS, H. V. Emerging Concepts in Alzheimer's Disease. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 10, n. 1, p. 291–319, 2015.

WALKER, D. G. et al. Association of CD33 Polymorphism rs3865444 with Alzheimer's Disease Pathology and CD33 Expression in Human Cerebral Cortex. **Neurobiol Aging**, v. 36, n. 2, p. 571–582, 2015.

WALSH, D. M.; SELKOE, D. J. Deciphering the Molecular Basis of Memory Failure in Alzheimer's Disease. **Neuron**, v. 44, n. 1, p. 181–193, 30 Sep. 2004.

WECHSLER-REYA, R. et al. Structural Analysis of the Human BIN1 Gene: evidence for tissue-specific transcriptional regulation and alternate RNA splicing. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 50, p. 31453–31458, 12 Dec. 1997.

WEIS, J. H. et al. A complement receptor locus : genes encoding C3b / C4b receptor and C3d / Epstein-Barr virus receptor map to 1q32 . **The Journal of Immunology**, v. 138, n. 1, p. 312–315, 1987.

WELLER, R. O. et al. Perivascular drainage of amyloid-B peptides from the brain and its failure in cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer's disease. **Brain Pathology**, v. 18, n. 2, p. 253–266, 2008.

WHEELER, D. L. et al. Database resources of the National Center for Biotechnology Information: update. **Nucleic acids research**, v. 32, n. Database issue, p. D35-40, 1 Jan. 2004.

WILSON, C. J.; FINCH, C. E.; COHEN, H. J. Cytokines and cognition--the case for a head-to-toe inflammatory paradigm. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 50, n. 12, p. 2041–56, Dec. 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL. **Dementia: a public health priority**. United Kingdom: [s.n.]. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2012/9789241564458_eng.pdf>.

XIONG, M. et al. A systems biology approach to genetic studies of complex diseases. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 579, n. 24, p. 5325–5332, 2005.

YAMADA, T.; AKIYAMA, H.; MCGEER, P. L. Complement-activated oligodendroglia: A new pathogenic entity identified by immunostaining with antibodies to human complement proteins C3d and C4d. **Neuroscience Letters**, v. 112, n. 2–3, p. 161–166, 1990.

YU, J.-T.; TAN, L.; HARDY, J. Apolipoprotein E in Alzheimer's Disease: An Update. **Annual Review of Neuroscience**, v. 37, n. 1, p. 79–100, 8 Jul. 2014.

YU, J. T.; TAN, L. The role of clusterin in Alzheimer's disease: Pathways, pathogenesis, and therapy. **Molecular Neurobiology**, v. 45, n. 2, p. 314–326, 2012.

ZAFARI, S. et al. Circulating Biomarker Panels in Alzheimer's Disease. **Gerontology**, 2015.

ZHANG, Y. et al. An RNA-Sequencing Transcriptome and Splicing Database of Glia, Neurons, and Vascular Cells of the Cerebral Cortex. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 36, p. 11929–11947, 3 Sep. 2014.