

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

Camporez, Daniela, 1987 - C198b Biomarcadores de diagnóstico complementar na doença de Alzheimer : enfoque em genes que participam da formação da placa beta-amiloide, via do folato e geração de estresse oxidativo / Daniela Camporez – 2018. 113 f. : il. Orientador: Flavia de Paula. Coorientador: Maria do Carmo Pimentel Batitucci.

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



RENORBIO - REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

BIOMARCADORES DE DIAGNÓSTICO COMPLEMENTAR NA DOENÇA DE  
ALZHEIMER: enfoque em genes que participam da formação da placa beta-amiloide,  
via do folato e geração de estresse oxidativo

DANIELA CAMPOREZ

VITÓRIA - ES

2018

DANIELA CAMPOREZ

BIOMARCADORES DE DIAGNÓSTICO COMPLEMENTAR NA DOENÇA DE  
ALZHEIMER: enfoque em genes que participam da formação da placa beta-amiloide,  
via do folato e geração de estresse oxidativo

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia - Ponto Focal Espírito Santo, Rede  
Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), como  
requisito parcial para obtenção do título de Doutora em  
Biotecnologia.

Orientadora: Dra Flavia de Paula.

Coorientadora: Dra Maria do Carmo P. Batitucci.

VITÓRIA  
2018

DANIELA CAMPOREZ

BIOMARCADORES DE DIAGNÓSTICO COMPLEMENTAR NA DOENÇA DE  
ALZHEIMER: enfoque em genes que participam da formação da placa beta-amiloide,  
via do folato e geração de estresse oxidativo

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Ponto Focal Espírito  
Santo, Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), como requisito parcial para  
obtenção do título de Doutora em Biotecnologia

Avaliada em 06 de Junho de 2018.

COMISSÃO EXAMINADORA

---

Dra Flavia de Paula  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Orientadora

---

Dra Maria do Carmo Pimentel Batitucci  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Coorientadora

---

Dra Sandra Ventorin von Zeidler  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Membro interno

---

Dra Sônia Alves Govêa  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Membro Externo

---

Dr Renato Lirio Morelato  
Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória  
Membro externo

---

Dra Flavia Imbrosi Errera  
Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória  
Membro externo

*Aos meus amores, Mãe, Marina, Marcela e Du, dedico.*

“Lembre-se, é fácil esquecer para quem tem memória,  
difícil esquecer para quem tem coração...”  
Gabriel García Márquez

“Não me rejeites na minha velhice,  
não me abandones quando se vão as minhas forças”.  
(Salmos: 71.9)

## AGRADECIMENTOS:

Agradeço primeiramente a Deus por toda a graça, força e amor incondicional de Pai e a Nossa Senhora pela interseção de mãe.

A minha família por sempre acreditar em mim, e por fazerem da minha vida uma alegria constante mesmo nos momentos mais difíceis, e claro, nos vários momentos de alegria. Agradeço em especial a minha mãe, meu exemplo de bondade, cuidado e amor sem limites. A Marina e Marcela mais que irmãs, partes de mim, obrigada pela paciência, por acreditarem em mim nas inúmeras vezes que nem eu mesma acreditava. Vocês estarão sempre em meu coração.

Ao Du, marido, amigo, companheiro. Sem todo seu apoio e compreensão eu não teria conseguido. Meu amor e admiração por você crescem a cada dia!

À Flavia, orientadora, colaboradora, conselheira, professora, amiga, que possibilitou a minha continuidade no laboratório de genética humana, trabalhando com a doença de Alzheimer ao longo dos últimos dez anos

À professora Maria do Carmo por aceitar ser minha Co-orientadora, e me ajuda desde a época da graduação

Ao Doutor Renato Morellato, que nos possibilitou um convívio maior e melhor com os idosos.

À professora Lúcia Sagrillo, por todo auxílio nas análises estatísticas, momentos únicos de aprendizado e amizade.

Aos amigos do Núcleo de Genética Humana e Molecular, aqueles que passaram por aqui: Luciano Belcavello, Clara Barbirato, e Leila Dias não tenho como agradecer por todas as vezes que interrompiam o que estavam fazendo para sempre, com muita disposição, me ajudar!! Maíra, pela amizade e apoio indispensável.

De forma especial agradeço a amiga Gillian. Reza a lenda que eu não gostava dela no início, mas tudo não passou de um super mal entendido... Amiga de todas as horas, boas ou ruins, de todo tipo de ajuda, de uma dedicação e comprometimento singulares. Estaremos sempre juntas!

A todos os amigos do doutorado: pessoas vocês são tudo de bom! Amo todos vocês, agradeço em especial a Lucas, Gabi e Lidi por me aturarem nos momentos de desesperos, e não me deixarem desanimar.

À toda equipe do Hospital da Santa Casa de Misericórdia de Vitória e do Abrigo à Velhice Desamparada Auta Loureiro Machado (AVEDALMA), por nos acolher e estarem sempre prontos a ajudar.

Aos professores membros da Banca Avaliadora, pela disponibilidade, participação e avaliação desse trabalho.



À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação no Espírito Santo (FAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento parcial dessa pesquisa.

E de forma muito especial meu agradecimento de coração, aos idosos, meus velhinhos como costume chamar, e seus familiares, por contarem um pouco da sua vida, e confiarem em nós.

## RESUMO

A doença de Alzheimer (DA), é o tipo mais comum de demência relacionada a idade. É uma doença neurodegenerativa crônica, grave, progressiva, associada à perda de memória e cognição, que pode levar à morte. O maior fator de risco para o desenvolvimento da doença é a idade avançada, com uma complexa interação de fatores ambientais e genéticos que juntos podem aumentar a incidência da doença. Ainda que sua causa seja desconhecida, os fatores genéticos e o estresse oxidativo desempenham um papel importante na patogênese da DA. Neste estudo de associação nós investigamos se polimorfismos nos genes *APOE* (*rs429358* e *rs7412*), *FOXO3* (*rs2802292*), *MTHFD1L* (*rs11754661*), *SERPINA3* (*rs4934*), *SIRT1* (*rs2273773*) e *SOD2* (*rs4880*) e fatores ambientais como: nível educacional, etnia e gênero estão associados com risco para a DA em uma amostra de 332 indivíduos idosos do sudeste brasileiro (109 pacientes com diagnóstico provável de DA e 223 controles - idosos saudáveis pareados por idade e gênero). Os polimorfismos genéticos foram analisados por meio da reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR-RT). Na nossa amostra o polimorfismo do gene *APOE* mostrou estar altamente associado com a doença, tendo os genótipos  $\epsilon 4\epsilon 4$  e  $\epsilon 3\epsilon 3$  demonstrado serem fator de risco e proteção, respectivamente. O genótipo GG do gene *MTHFD1L* mostrou estar associado com o aumento do risco de desenvolver a doença de Alzheimer. Já o genótipo GG e AG do gene *SERPINA3* demonstraram ser fatores de proteção e risco, respectivamente. O genótipo TT e CT do gene *SIRT1* também mostraram correlação com a doença. O nível educacional mostrou estar associado positivamente para os indivíduos do grupo controle que tiveram uma educação formal por mais de quatro anos. Os polimorfismos *FOXO3* e *SOD2* não demonstraram estar associados com a amostra e a doença em questão. Nossos resultados corroboram outras pesquisas, que demonstram que a etiologia da DA pode estar envolvida com alterações na via do folato,

com o aumento do estresse oxidativo nas células do sistema nervoso central, além de apoiar a participação de proteínas formadoras das placas beta-amiloides na patologia da DA. Esses resultados podem ser úteis na busca de biomarcadores genéticos precoces capazes de identificar os sintomas do surgimento da demência, e fornecer novos dados para terapias no futuro, ajudando no entendimento deste distúrbio. Além disso, reforçam a hipótese de que diversos genes estão envolvidos na etiologia da DA, uma condição caracterizada também por instabilidade genômica e estresse oxidativo elevados, que podem contribuir significativamente para a degeneração neurológica observada nos pacientes.

**Palavras-chave:** doença de Alzheimer; Estudo de Associação; *APOE*; *MTHFD1L*; *SERPINA3*; *FOXO3*; *SIRT1*; *SOD2*; Estresse Oxidativo.

## ABSTRACT

Alzheimer Disease (AD) is the most common type of dementia related to aging. It is a serious, chronic and progressive pathology, associated with memory and cognition loss, that leads to death. The mayor risk factor for this disease development is the advanced age, that with a complex interaction of environmental and genetic factors all together can increase the incidence of the disease. Even though its cause is still unknown, the genetic factors and the oxidative stress play an important role in the AD pathogenesis. In this association study we have investigated if polymorphisms in the genes *APOE* (rs429358 and rs7412) *FOXO* (rs2802292) *MTHFD1L* (rs11754661) *SERPINA3* (rs4934) *SIRT1* (rs2273773) and *SOD2* (rs4880) and environmental factors such as: educational level, ethnicity and sex are associated with risk to the AD, in a sample of 332 old individuals from the southeast in Brazil (109 individuals with a probably diagnosis of AD and 223 controls – healthy old individuals, paired by age and sex. The genetic polymorphisms were analyzed through the real time polymerase chain reaction (RT-PCR). In our sample the gene polymorfism *APOE* showed to be highly associated with the disease, both the genotypes  $\epsilon 4\epsilon 4$  and  $\epsilon 3\epsilon 3$  proved to be a factor of risk and protection respectively. The GG genotype of the *MTHFD1L* gene has been shown to be associated with an increased risk of developing Alzheimer's disease. As the genotype GG and AG of the *SERPINA3* gene were shown to be protection and risk factors, respectively. The TT and CT genotypes of the *SIRT1* gene also showed a correlation with the disease. The educational level showed to be positively associated with the control group individuals, who had a formal education for more than four years. *FOXO3* and *SOD2* did not prove to be statistically associated with the sample and the disease in question. Our results corroborate other studies demonstrating that the etiology of AD may be involved with the folate pathway, with increased oxidative stress in cells of the central nervous system and supports the participation of beta-amyloid plaque forming proteins in the pathology of AD. These results can be useful in the research of genetic biomarkers to identify individual symptoms before the dementia appears and to offer new data for therapy in the future, helping in the understanding of this disorder and how to respond to it. These results may be useful in the search for early genetic biomarkers capable of identifying the onset of dementia, and provide new data for therapies in the future, helping to understand this disorder. In addition, they reinforce the hypothesis that several genes are involved in the etiology of

AD, a condition characterized by high genomic instability and oxidative stress, which may contribute significantly to the degeneration observed in patients

**Key word:** Alzheimer disease; Association study; *APOE*; *MTHFD1L*; *SERPINA3*; *FOXO3*; *SIRT1*; *SOD2*; Oxidative Stress.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Desenho feito por Alois Alzheimer em 1911 .....	21
Figura 2: Relações interativas de farmacologia, bioquímica e genética na doença de Alzheimer.....	25
Figura 3: Esquema da localização cromossômica dos genes relacionados a doença de Alzheimer.....	26
Figura 4: Esquema da clivagem alterada da proteína $\beta$ amiloide e seu posterior acúmulo no cérebro de indivíduos com doença de Alzheimer.....	27
Figura 5: as diversas atuações do alelo Apo $\epsilon$ 4 .....	28
Figura 6: Agregação da proteína Tau e da $\beta$ amiloide no sistema nervoso.....	30
Figura 7: Hipótese da Cascata Amiloide: um modelo onde o gene atua de forma central fonte.....	32
Figura 8: Mecanismo molecular envolvendo a hipótese da Cascata Amiloide.....	33
Figura 9: Alterações na eficiência energética neuronal durante o envelhecimento normal.....	34
Figura 10: Relações citoarquitetônicas de astrócitos.....	37
Figura 11: Ilustração esquemática de regiões estruturais e funcionais de APOe.....	41
Figura 12: Formação de APOe e seu papel na redistribuição de lipídios para as células do SNC.....	42
Figura 13: Funções dos fatores de transcrição Foxo3 no sistema imunológico.....	46
Figura 14: <i>SIRT1</i> no desenvolvimento neurológico e na senescência cerebral.....	48
Figura 15: Estresse oxidativo no cérebro.....	50
Figura 16: Comprovação da submissão do Manuscrito 1.....	53
Figura 17: Comprovação da submissão do Manuscrito 2.....	68

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- a.C. - antes de Cristo
- ABRAZ - Associação Brasileira de Alzheimer
- ACT - alpha-1-antichymotrypsin
- APOE - Apolipoproteína E (Apolipoprotein E)
- APP - Proteína Precursora da Amiloide (amyloid beta precursor protein)
- CDR - Clinical Dementia Rating Scale
- DA - doença de Alzheimer
- DAE - doença de Alzheimer Esporádica
- DAF - doença de Alzheimer Familiar
- d.C. – depois de Cristo
- ENF - emaranhados neurofibrilares
- EROs - espécies reativas de oxigênio
- FOXO - Forkhead box O
- FOXO3 – Forkhead box O3*
- GWAS - Genome Wide Association
- HCA - Hipótese da Cascata Amilóide
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- MMSE - Mini-Mental State Examination
- MTHFD1L - Methylene tetrahydrofolate Dehydrogenase
- PCR - Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction)
- PSEN1 - Gene da Pré-senilina 1
- PSEN2 - Gene da Pré-senilina 2
- PS1 - Proteína Pré-senilina 1
- PS2 - Proteína Pré-senilina 2
- SIR2 – Silent Information Regulator 2*
- SIRT1 – Silent Information Regulator Type 1*
- SIRT1 – sirtuína
- SNP - Polimorfismo de Nucleotídeo Único (Single Nucleotide Polymorphism)
- SOD – superóxido dismutase
- SOD2 – Superoxide dismutase 2*
- VLDL-c – lipoproteína de muito baixa densidade

## SÚMARIO

1 INTRODUÇÃO .....	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 Histórico.....	19
2.2 Características Histopatológicas da Doença.....	22
2.3 Fatores Ambientais e o risco para doença de Alzheimer.....	23
2.4 Formas Familiais.....	25
2.5 Casos Esporádicos da doença de Alzheimer.....	27
2.6 Biomarcadores na doença de Alzheimer.....	29
2.7 Hipóteses para a doença de Alzheimer.....	29
2.7.1 Hipótese da Cascata Amilóide.....	30
2.7.2 Hipótese da Cascata Mitocondrial.....	33
2.7.3 Hipótese Metabólica.....	35
2.7.4 Hipótese Vascular.....	37
2.7.5 Hipótese Metálica.....	38
2.8 Caracterização dos Genes Investigados.....	40
2.8.1 APOE.....	40
2.8.2 MTHFD1L.....	43
2.8.3 SERPINA3.....	44
2.8.4 FOXO3.....	45
2.8.5 SIRT1.....	46
2.8.6 SOD2.....	47
2.9 Estresse Oxidativo e sua contribuição na doença de Alzheimer.....	48
2.10 Perspectiva de Tratamento.....	49
2.11 Potencial Biotecnológico.....	50
3 OBJETIVOS.....	51
3.1 OBJETIVO GERAL.....	51
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	51
4 ARTIGOS CIENTÍFICOS DERIVADOS DA TESE.....	52
4.1 Manuscrito 1 - Association study of MTHFD1L, SERPINA3, FOXO3 and APOE variants in Alzheimer disease .....	53
4.2 Manuscrito 2 – Positive association of a SIRT1 variant and parameters of oxidative stress on alzheimer’s disease.....	68



5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89
6 Considerações Finais.....	105
APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	104
APÊNDICE B – Questionário de Saúde Pessoal.....	106

## 1.INTRODUÇÃO

Atualmente, 47 milhões de pessoas vivem com demência em todo o mundo, sendo a forma de demência mais comum entre idosos a doença de Alzheimer (PRINCE et al., 2016). A doença de Alzheimer (DA) é caracterizada pelo declínio gradual da memória e pela perda progressiva das funções cognitivas que ocorrem dentre outros fatores pela morte neuronal de regiões cerebrais que incluem o córtex cerebral, o hipocampo e o córtex entorrinal (SELKOE, 2001). Além disto, pacientes com DA possuem acúmulo de proteína Beta Amiloide ( $A\beta$ ) no cérebro na forma de placas senis e apresentam emaranhados neurofibrilares formados de proteína tau hiperfosforilada (GIRI; ZHANG; LÜ, 2016).

Segundo uma pesquisa realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a expectativa de vida do brasileiro nascido em 2015 aumentou e passou a ser de 75,5 anos. Em 2014, era de 75,2 anos. De 1940 a 2015, a esperança de vida no Brasil para ambos os sexos passou de 45,5 anos para 75,5 anos, um aumento de 30 anos (DEMOGRÁFICO, 2015). No Brasil, aproximadamente 1,2 milhões de pessoas vivem com a doença de Alzheimer, o que equivale a 6% da população idosa (DEMOGRÁFICO, 2012), esse número de acordo com a Associação Brasileira de Alzheimer (ABRAZ) deve ser bem mais expressivo, visto que a doença é subdiagnosticada em várias partes do país.

A DA é subdividida em dois grupos: a doença de Alzheimer Familiar (DAF), que apresenta padrão de herança autossômico dominante. Nestes casos, indivíduos portadores de uma única mutação, desenvolvem a DA, em geral, mais jovens (antes dos 65 anos de idade). Contudo, estas formas de herança são raras entre os casos de DA, a mais de 90% dos pacientes com DA apresentam a forma esporádica da doença (DAE) que manifesta se em geral a partir dos 65 anos de idade (início tardio). Nestes casos a doença possui etiologia multifatorial, sendo desencadeada devido ao acúmulo de eventos genéticos e ambientais, que aumentam a suscetibilidade para a DA. O segundo tipo, de início tardio, é a forma mais comum de demência e apresenta um padrão de herança não mendeliano, mas ainda assim, com um componente claramente herdável (SCHNEIDER et al., 2012).

A DAE não é considerada uma doença genética, pois até o momento nenhum gene que determine se o indivíduo vai ou não desenvolver a doença já foi identificado. Entretanto, algumas variantes genéticas aumentam o risco de desenvolvê-la, particularmente o alelo

$\epsilon 4$  do gene da *Apolipoproteína E (ApoE)*, envolvida no transporte de colesterol (COON et al., 2007). Um indivíduo que carrega duas cópias desse alelo tem de 12 a 15 vezes mais risco de desenvolver DAE e um início dos sintomas mais precoce do que um indivíduo que desenvolve a doença, mas carrega apenas uma ou nenhuma cópia do alelo *ApoE $\epsilon 4$*  (BLACKER et al., 1997; RAJAH et al., 2017). Outros genes parecem estar relacionados com risco aumentado para DAE. Dentre eles, o gene *MTHFD1L (Methylenetetrahydrofolate Dehydrogenase)* envolvido na via do folato e consequentemente da homocisteína, o que poderia ocasionar um risco para manifestação da doença de Alzheimer (CLARKE et al., 1998; MCCADDON et al., 1998). Diversos estudos apontam que existe um elevado nível de homocisteína relacionado ao baixo desempenho cognitivo e com a DA (MORRIS, 2003; VAN DAM; VAN GOOL, 2009). Outro gene, esse envolvido na via de inflação da DA, é o *SERPINA3*. A proteína codificada por esse gene é considerada a segunda mais encontrada nas placas senis em cérebros de pacientes acometidos pela DA sendo atualmente estudada como um possível biomarcador da doença (ABRAHAM; SELKOE; POTTER, 1988; STYREN; KAMBOH; DEKOSKY, 1998). Já o gene *FOXO3 (Forkhead box O3)* tem mostrado relação com algumas doenças neurodegenerativas, incluindo a doença de Alzheimer (AKHTER; SANPHUI; BISWAS, 2014; SAHIN et al., 2013). Esse fator de transcrição está envolvido com apoptose, resposta ao estresse oxidativo, metabolismo da glicose e envelhecimento (ABRAMOV; CANEVARI; DUCHEN, 2004; FERNANDEZ et al., 2012). Os genes *SIRT1 (Silent Information Regulator Type 1)* e *SOD2 (Superoxide dismutase 2)* estão envolvidos com a resposta ao estresse oxidativo, possuem um importante papel na promoção da saúde, longevidade e doenças relacionadas ao envelhecimento (AKBARALY et al., 2013; FIGARSKA; VONK; BOEZEN, 2013; FLYNN; MELOV, 2013).

Complementarmente aos estudos moleculares, existe uma atenção crescente em avaliar a presença de danos cromossômicos em células somáticas de pacientes com doenças neurodegenerativas, na busca de possíveis biomarcadores que possam ser úteis no diagnóstico complementar da doença. As diretrizes atualizadas recomendam que o diagnóstico da DA seja baseado nos sinais psiquiátricos e neurológicos, nos achados de imagem e na presença de biomarcadores (CHENG et al., 2018).

A definição do estresse oxidativo, pode estar relacionada ao desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e os mecanismos de defesa celular contra os danos provocados por eles, sendo em sua maioria os danos cromossômicos, (MOREIRA et al., 2006). Os radicais livres são continuamente produzidos pelas células vivas porém, seu acúmulo, relacionado ao envelhecimento, pode resultar em danos em praticamente todos os componentes celulares, incluindo o material genético. As EROs também reagem com ácidos graxos poliinsaturados para gerar diversos intermediários citotóxicos, dentre eles o malondialdeído, uma substância que tem sido amplamente utilizada como indicadora de estresse oxidativo em humanos (TORRES et al., 2011; LÓPEZ et al., 2013).

Além das variantes genéticas, diversos fatores ambientais parecem influenciar o risco ou proteção para DAE, incluindo atividades física e cognitiva, dieta, obesidade, hipertensão, tabagismo e ingestão de metais pesados. Entretanto, a idade é o seu principal fator de risco. Estudos indicam que, ao redor do mundo, a incidência de demência entre as idades de 65 e 90 anos dobra aproximadamente a cada 5 a 6 anos e continua a crescer exponencialmente após os 90 anos (CORRADA et al., 2010). Esse crescimento exponencial no número de pessoas com demência é impulsionado pelo aumento da expectativa de vida da população, especialmente em países em desenvolvimento. O impacto decorrente desse fenômeno é não somente emocional, mas também social e econômico, pois refletirá em um alto custo para os sistemas de saúde, para os pacientes e seus cuidadores (LUZARDO; GORINI; SILVA, 2006).

Nas últimas décadas houve um progresso significativo no entendimento dos mecanismos moleculares e bioquímicos da doença e a aplicação desses conhecimentos em novas tecnologias e tratamentos. Há um interesse crescente em avaliar também, por estudos moleculares, pacientes com doenças neurodegenerativas, na busca de possíveis biomarcadores que possam ser úteis no diagnóstico complementar da doença ou em um diagnóstico precoce (BAZENET; LOVESTONE, 2012).

Diante do exposto, novas informações acerca desta doença poderão auxiliar na identificação do perfil genético de suscetibilidade específica de cada indivíduo acometido pela DA. Estes fatores coordenados em populações idosas ainda não estudadas irão melhorar o nosso conhecimento sobre a causa da DA, sobre quais vias bioquímicas, quais proteínas atuam de forma decisiva para o acometimento da Doença. Auxiliando no

diagnóstico precoce e preciso desta doença, unindo pesquisa clínica e básica. Dentre as diversas abordagens de estudo, a pesquisa dos genes de predisposição à doença, e a validação de biomarcadores de prognóstico podem trazer novos conhecimentos científicos e estabelecer estratégias públicas de acompanhamento e cuidado mais efetivos, sejam preventivos ou de diagnóstico, de acordo com o perfil genético de cada paciente.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Histórico sobre a doença Alzheimer**

A demência é uma desordem cerebral que afeta seriamente a capacidade de realização de atividades diárias e rotineiras resultando em grandes prejuízos socioeconômicos (CABEZA, 2001; GRADY; CRAIK, 2000). A doença de Alzheimer (DA), enfermidade neurodegenerativa progressiva do cérebro, é a principal causa de demência nos idosos, com prevalência de mais de 47 milhões de casos no mundo. Com o aumento significativo da expectativa de vida - e consequentemente maior número de idosos na população mundial - essa debilidade torna-se atualmente um importante problema de saúde pública. (PRINCE et al., 2016).

Atualmente, já é de domínio público o significado de termos como demência, doença de Alzheimer, Esquizofrenia, dentre outras condições clássicas da psiquiatria. Porém muito antes dessa civilização moderna ou da descrição relatada pelo médico alemão, Alois Alzheimer, de uma doença que até então seria rara, que os males causados pelas atividades cerebrais imperfeitas já eram conhecidos, não na magnitude e com a compreensão de hoje, mas com a sabedoria dos tempos passados (BOLLER; FORBES, 1998).

Por volta de 2000 Antes de Cristo (a.C), os egípcios já entendiam que existia uma “vida mental”, apesar de acharem que essa era regida pelo coração e diafragma. Mas já era de conhecimento deles, que a idade poderia vir acompanhada de desordens memoriais. Sólon, pensador grego, que viveu entre os anos de 630-560 a.C, escreveu que o julgamento pode ser prejudicado por: *“dor física, violência, drogas, idade avançada ou*

*a persuasão de uma mulher*”. Nos anos seguintes entre 130-201 depois de Cristo (d.C), pensadores como: Aulus Cornelius, Celsus, Galeano e Aretheus, já distinguiam: delírio de demência (ALBERT; MILDWORF, 1989). Na idade média, a demência não pareceu inspirar tanto os pensadores, pesquisadores, médicos ou naturalistas, provavelmente por conta da Peste Negra que dizimou boa parte da população Europeia.

O fundador da Psiquiatria Moderna – Philippe Pinel – (1745-1826), foi um dos primeiros autores a realizar uma boa descrição dos tipos demenciais (AMADUCCI; ROCCA; SCHOENBERG, 1986; TORACK, 1983). No ano de 1840 nos Estados Unidos da América, foi feito um manual: “como reconhecer uma desordem mental” nomeado de: Diagnostic and Statistical Manual or Mental Disorders (DMS). Esse manual só foi desenvolvido em maior escala, após sua publicação, já na sexta edição do “International Classification of Diseases” (ICD-6) (EDITION; ASSOCIATION, 1994) o qual pela primeira vez incluiu uma seção de “desordens mentais”, e que foi utilizado até o final da década de 90. Esse critério de demência, unido ao “National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke” (NINCDS) e ao manual: “Alzheimer’s Disease and Related Disorders Association” (ADRDA), (KHAN et al., 1984) foi amplamente difundido no mundo e largamente utilizado e validado em diversos países (MIRRA et al., 1991; MOMS et al., 1989).

Esses manuais foram criados pela necessidade eminente de saber classificar a diversidade de condições demenciais que afetavam pessoas das mais diversas classes sociais, etnias, sexos entre outros fatores, mas o mais relevante, de acordo com a idade.

Em 1892 foi descrito em Paris por Philippe Pinel e Jean Étienne Esquirol (psiquiatras) as placas senis, para casos de epilepsia. Mais tarde, em 1906, foi relatado em Praga, em pacientes com demência. Na Alemanha o psiquiatra Alois Alzheimer trabalhava com brilhantes neurocientistas como: Kraepelin, Nissl, Lewy e Cerletti. No ano de 1907, Alois Alzheimer, publicou um artigo (ALZHEIMER, 1907; STRASSNIG; GANGULI, 2005) que ele pensava ser de uma doença rara, onde descreve o quadro clínico de uma paciente: a senhora: August D. Nas palavras de Alois Alzheimer “*a Sra August D. apresentava um quadro singular que não permitia ser enquadrado em nenhuma das enfermidades conhecidas até o momento. É que vou descrever a seguir...*”. *Trata-se de uma mulher de 51 anos de idade que começou a ter crises de ciúmes infundados de seu marido como*

*primeira manifestação de sua doença. Logo ficou muito aparente uma perda progressiva de memória; não encontrava o caminho para voltar para casa e se perdia tentando conseguir, levava seus pertences pessoais daqui para lá e os escondia em lugares inapropriados, de vez em quando acreditava que alguém queria matá-la e gritava muito e alto*”. Após o falecimento desta paciente em 1906, o Dr. Alois Alzheimer realizou um exame patológico cerebral e encontrou mudanças histopatológicas ainda não descritas na literatura que seriam, mais tarde, denominadas placas senis e emaranhados neurofibrilares (Figura 1) (THOMAS; FENECH, 2006). Seus resultados foram divulgados na 37ª Conferência Anual de Psiquiatras, Berlim (1907), onde ele caracterizou a doença como uma patologia altamente debilitante e com características histopatológicas peculiares (HIPPIUS; NEUNDORFER, 2003).

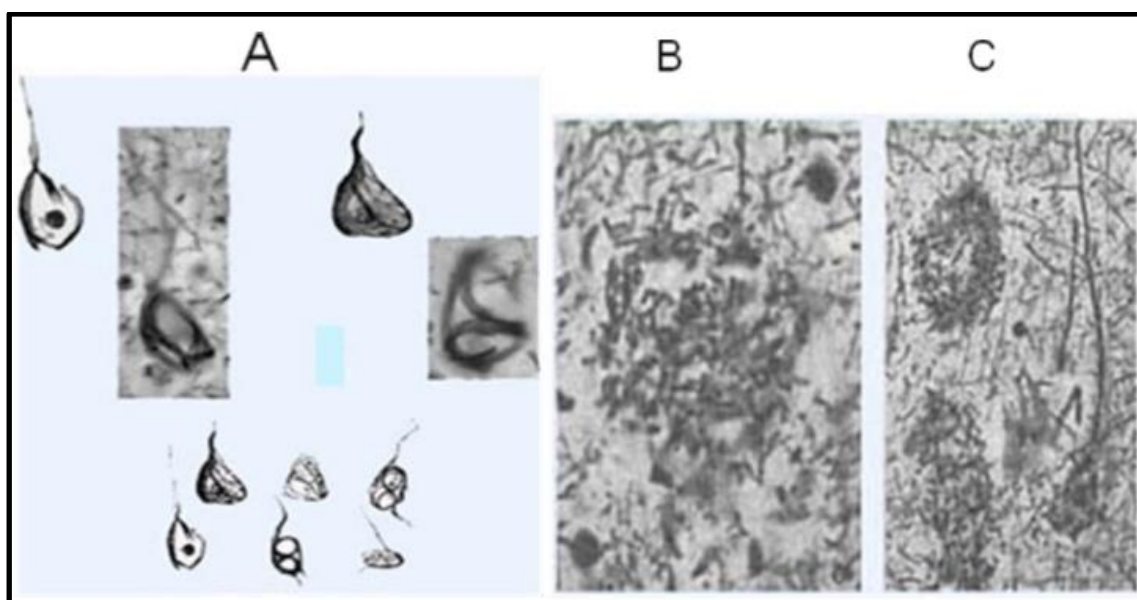


Figura 1: Desenho feito por Alois Alzheimer em 1907. Imagens representando: A) novelos neurofibrilares (aumento de 25x), B) placa neurítica e C) novelo neurofibrilar (aumento de 100x). (THOMAS; FENECH, 2006)

O psiquiatra alemão Emil Kraepelin foi a primeira pessoa a utilizar o termo “doença de Alzheimer” em 1910, referindo-se à forma de demência de início precoce, distinguindo-a da forma de demência de início tardio (BOLLER; FORBES, 1998). Apenas em 1968, Blessed, Tomlinson e Roth (BLESSED; TOMLINSON; ROTH, 1968) perceberam que as mudanças ocorridas em cérebros com características neuropatológicas que se assemelhavam a doença de Alzheimer, estava intimamente relacionada à idade avançada.

A partir desse momento, compreendeu-se que a doença de Alzheimer de início tardio, e a doença de Alzheimer de início precoce dividiam o mesmo quadro clínico e características histopatológicas (CAIXETA, 2012). Em 1975 apenas 42 artigos incluíam a palavra *Alzheimer* como palavra chave de busca para periódicos, no ano de 2018 utilizando o site National Center for Biotechnology Information (NCBI) e inserindo a mesma palavra são encontrados 98.338 periódicos (NCBI, 2018).

A DA é progressiva, incurável e fatal. Ela se caracteriza por uma degeneração das células em regiões cerebrais distintas, um processo que se inicia 10 a 20 anos antes do aparecimento dos sintomas (CARRILLO; THIES; BAIN, 2012). A perda de memória é usualmente o primeiro sintoma da DA, porém, com a progressão da doença, o paciente é gradualmente afetado por outros sintomas, incluindo mudanças de personalidade, declínio na habilidade de falar e de entender o que outros dizem e dificuldade de tomada de decisões. Nos estágios finais da doença, os indivíduos afetados perdem a capacidade de interagir com o ambiente e de cuidar de si mesmos. A morte dos pacientes ocorre geralmente entre 3 e 9 anos após o diagnóstico (HENRY; QUERFURTH; LAFERLA, 2010).

No entanto, no Brasil e em outros países em desenvolvimento, o aumento da população idosa em geral carece de políticas sociais, econômicas e de saúde, voltadas para esses cidadãos (NOGUEIRA et al., 2008). Dessa forma, existe a necessidade de adequação dessas políticas para a efetiva inclusão de idosos no convívio social, e em pesquisas que possam incrementar os estudos sobre envelhecimento, longevidade e qualidade de vida.

## **2.2 Características histopatológicas da doença Alzheimer**

A doença de Alzheimer (DA) possui dois perfis histopatológicos marcantes, que caracterizam a doença: o acúmulo de placas beta-amilóide ( $A\beta$ ) também conhecidas por placas senis, que são consequência da clivagem e acúmulo errôneo da proteína  $\beta$  amiloide. E os emaranhados neurofibrilares (ENF) encontrados nos tecidos cerebrais formado em grande parte pela hiperfosforilação da proteína tau nos neurônios (CARRASQUILLO et al., 2010).



A substância encontrada nas placas amiloides origina-se a partir de um produto peptídico do metabolismo da APP (*Proteína Precursora da Amiloide*). Três enzimas foram descritas por estarem implicadas na clivagem da APP, sendo elas: alfa ( $\alpha$ ), beta( $\beta$ ) e gama ( $\gamma$ ) secretases (NIXON; MATHEWS; CATALDO, 2001).

A proteína tau é sintetizada por um gene composto por 16 exons localizado no cromossomo 17q21 atuando como um dos componentes essenciais dos microtúbulos nas células. O grau de fosforilação da proteína tau determina a sua capacidade de estabilizar os microtúbulos, integrantes fundamentais do citoesqueleto, essenciais para a manutenção da estrutura neuronal e o transporte axonal de diversas substâncias, incluindo os neurotransmissores (LOVESTONE et al., 1994). Essa proteína é importante para a manutenção da estabilidade e da homeostase neuronal e sua hiperfosforilação leva a uma cascata de eventos com a formação de EROs devido ao estresse oxidativo, levando a um mal funcionamento cerebral (NICHOLLS, 2008) que pode culminar na morte neuronal.

### **2.3 Fatores ambientais e o risco para doença de Alzheimer**

A idade é o fator de risco mais importante para DA, mas estudos epidemiológicos sugerem que um baixo nível de escolaridade, história de traumatismo craniano, consumo com alto teor calórico - dietas ricas em gordura, sedentarismo, tabagismo podem cada uma aumentar o risco de DA (MATTSON; SHEA, 2003; MAYEUX, 2003).

Brucki e Nitrini (2008), Caramelli e Bottino (2007) e Nitrini et al. (2004, 2008) produziram dados interessantes sobre a associação positiva da DA com o analfabetismo na população brasileira. Eles comprovaram, aplicando testes em populações ribeirinhas da Amazônia, onde um grupo era formado por analfabetos e outro grupo por indivíduos escolarizados, que aqueles que possuíam um mínimo de contato educacional, apresentavam habilidades cognitivas mais duradouras.

Elementos culturais, como a dieta seguida por cada povo, também estão associadas ao risco para DA. Dados da literatura como os descritos por Scheltens et al. (2010) afirmam que uma abordagem multinutricional na fase mais precoce da doença tem um enorme valor terapêutico.

Grupos étnicos distintos também apresentam diferença quanto ao acometimento da DA. No trabalho de Yeo e Gallagher-Thompson (2006) foi possível observar que dentre um grupo de americanos de categorias étnicas distintas, os idosos brancos eram mais suscetíveis a DA do que o grupo de idosos afro-americanos e asiáticos.

Barnes e Yaffe (2011) realizaram um trabalho de meta-análise e concluíram que se todos os seis fatores de risco para DA no trabalho por eles realizado (baixa escolaridade, tabagismo, sedentarismo, obesidade, depressão e diabetes mellitos) fossem eliminados, cerca de 50% dos casos de DA poderiam ser prevenidos.

O desenvolvimento da doença de Alzheimer deve-se ao acúmulo de eventos genéticos e ambientais (figura 2). Cada um desses eventos contribui com pequenos efeitos que resultam, em conjunto, no estabelecimento da doença com diferentes graus de gravidade (FRIDMAN et al., 2004). Muitos fatores de risco foram caracterizados, incluindo idade e história familiar, ainda que alguns deles tenham mostrado resultados contraditórios em populações diversas (BRICKELL et al., 2006).

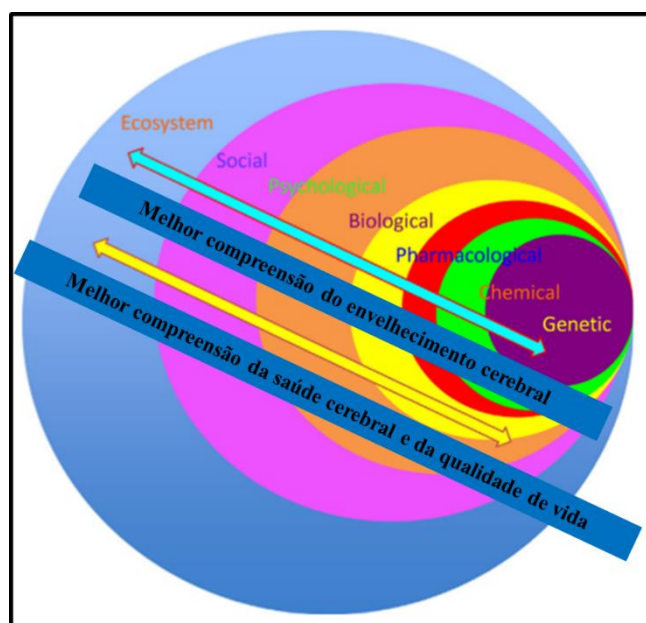


Figura 2: Relações interativas de farmacologia, bioquímica e genética, mostrando os vários níveis de análise que se fazem necessário para uma compreensão mais ampla e integrada do envelhecimento cognitivo associado a desafios para total compreensão da doença de Alzheimer. (Adaptado de: WHITEHOUSE, 2013).

#### 2.4 Formas familiares da doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer de início precoce ou familiar (DAF), é causada por mutações raras e herdadas de forma dominante, encontradas nos genes identificados até os dias atuais da: *Proteína Precursora Amilóide (APP)* localizada no cromossomo 21q21.1 (Tanzi et al., 1987), a *Presenilina 1 (PSEN1)* em 14q24.3 (SHERRINGTON et al., 1995) e a *Presenilina 2 (PSEN2)* em 1q42.1 (Levy-Lahad et al., 1995) (Figura 3). Essa forma tem como base o fator genético predominante.

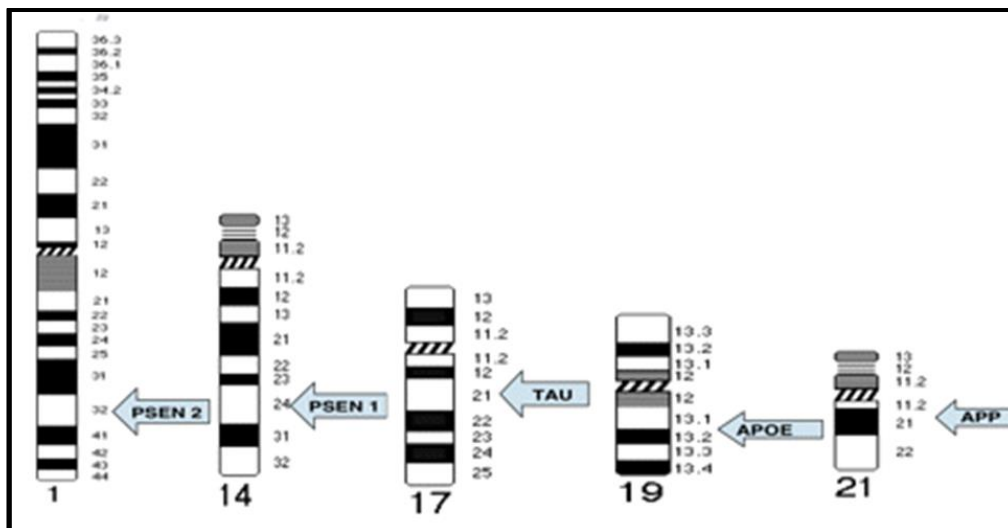


Figura 3: Esquema da localização cromossômica dos genes relacionados a DA (THOMAS; FENECH, 2006).

A APP é encontrada em muitos tecidos e órgãos, incluindo o cérebro e a medula espinhal. Ainda hoje pouco se sabe sobre a função da proteína precursora amiloide (MÜLLER; DELLER; KORTE, 2017; SHARIATI; DE STROOPER, 2013). Alguns trabalhos presumem que ela pode ligar-se a outras proteínas na superfície das células ou ajudar uma célula a se anexar a outra. Já outros estudos sugerem que no cérebro, ela ajude no direcionamento das células nervosas durante o desenvolvimento inicial (GUERREIRO; GUSTAFSON; HARDY, 2012). A respeito dos mecanismos moleculares, a proteína de membrana APP pode dar origem a moléculas protetoras ou potencialmente prejudiciais após a clivagem por diferentes secretases, conhecidas como  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  (Figura 4). (BRUNHOLZ et al., 2012). Esses processos de clivagem mantêm um equilíbrio entre diferentes produtos amiloidogênicos e não amiloidogênicos da APP (MATTSON et al., 1993).

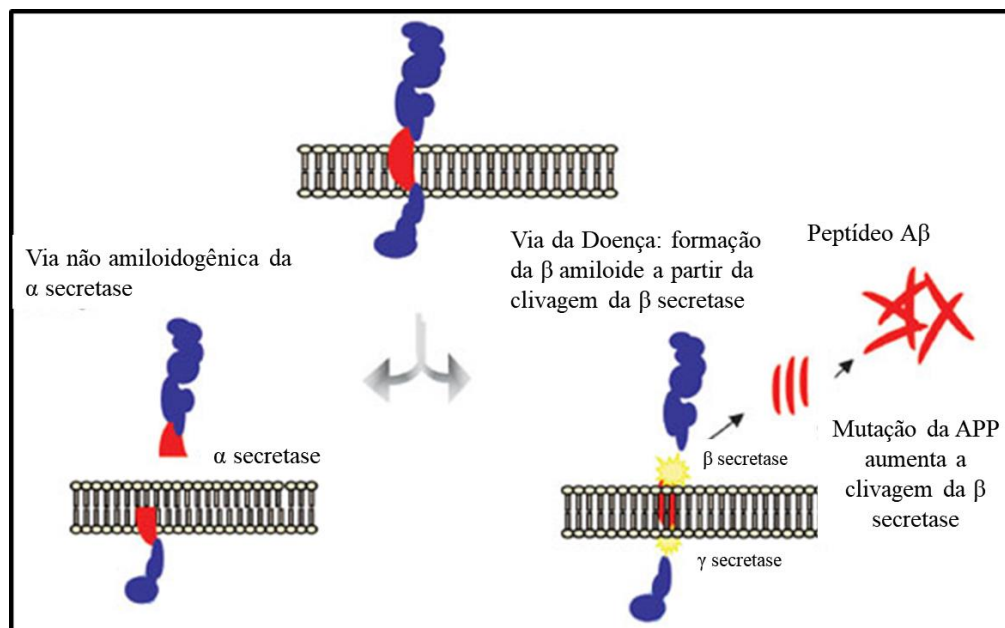


Figura 4: Esquema da clivagem não alterada realizada pela  $\alpha$  secretase e da clivagem errônea pela  $\gamma$  e posteriormente pela  $\beta$  secretase, ocasionando o acúmulo dos peptídeos A $\beta$ . (Adaptada de: VANESSA DE JESUS et al., [s.d].)

As proteínas presenilina 1 (PS1) e presenilina 2 (PS2), possuem estrutura semelhante, estão localizadas na membrana celular e provavelmente atuam no transporte celular (KUMAR-SINGH et al., 2006). Estudos sugerem que estas proteínas participam de mecanismos de apoptose através da interação com caspases. Acredita-se, porém, que este não seja o mecanismo mais frequente de morte neuronal na doença de Alzheimer (KIM et al., 1997). Mas por serem componentes vitais do complexo  $\gamma$ -secretase, que cliva APP em fragmentos A $\beta$  são assim corresponsáveis pela formação das placas senis (TANZI; BERTRAM, 2005).

## 2.5 Casos esporádicos da doença de Alzheimer

Os casos de doença de Alzheimer de início tardio são, em geral, esporádicos e com etiologia multifatorial. A forma pela qual a genética pode ser uma variável determinante no surgimento da doença de Alzheimer de início tardio tem provocado grande interesse dos cientistas, uma vez que, acredita-se que estes casos estejam relacionados não com

um, mas com vários genes que contribuem para aumentar o risco de manifestação da doença (CHUNG et al., 2009).

O aumento na chance de desenvolver a doença de Alzheimer pode ser causado pela presença de polimorfismos de risco, como o alelo  $\epsilon 4$  do gene da *ApoE* (Figura 5), considerado o maior fator de risco genético para o surgimento da doença. Porém, existem indivíduos portadores do alelo de risco *ApoE* $\epsilon 4$  que não manifestam a doença, sugerindo assim, a presença de outros fatores que podem influenciar na sua etiologia (BREITNER et al., 1999).

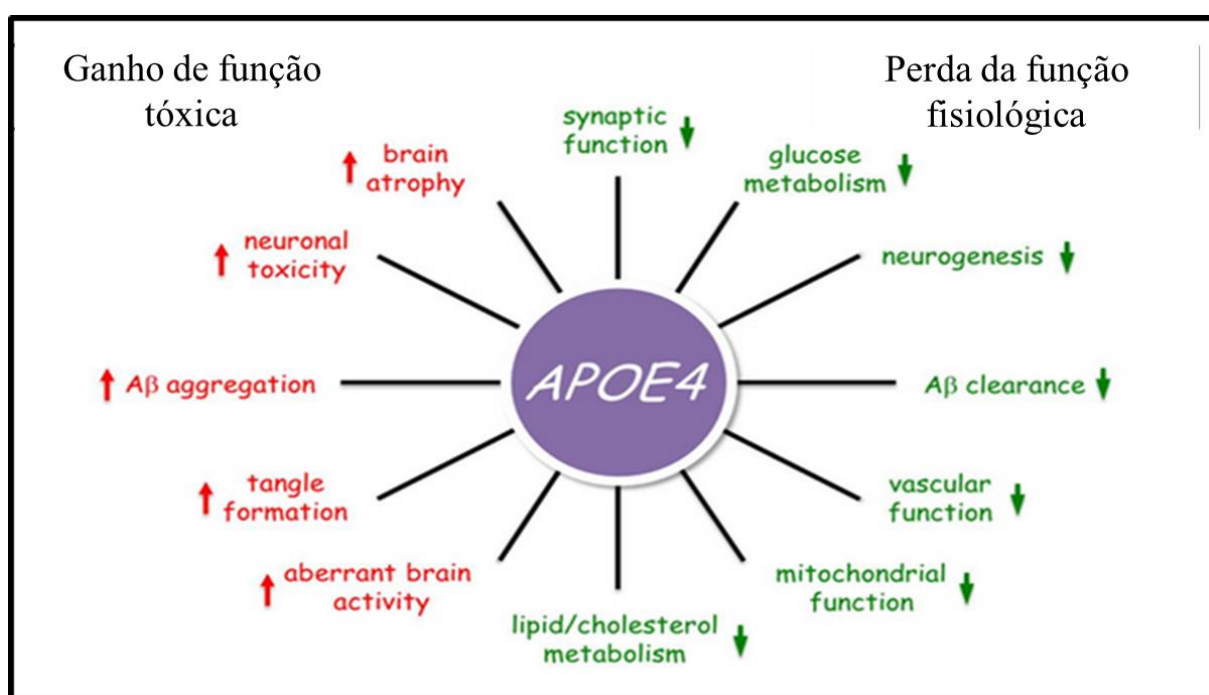


Figura 5: As diversas atuações do alelo *ApoE* $\epsilon 4$  (Adaptada de: LIU et al., 2013)

Como em outras doenças de etiologia multifatorial, os polimorfismos genéticos associados com suscetibilidade aumentada para a DAE variam entre diferentes populações mundiais, em função da constituição genética peculiar de cada grupo étnico. Isso demonstra a crescente necessidade de se estudar populações distintas na busca de polimorfismos de riscos. A descoberta de alelos de risco pode viabilizar a identificação de vias metabólicas que ajudem a compreender a etiologia da doença de Alzheimer e auxiliar a busca de alvos terapêuticos para esta enfermidade.

## 2.6 Biomarcadores na doença de alzheimer

Biomarcadores podem ser: físicos, fisiológicos, histológicos, anatômicos, bioquímicos, moleculares dentre outros. Podem ser células específicas como moléculas, genes, enzimas ou hormônios. Para a doença de Alzheimer, que não possui um diagnóstico preciso sendo na grande maioria dos casos diagnosticada clinicamente, esforços têm sido empregados para encontrar um marcador molecular e/ou de imagem capaz de proporcionar um diagnóstico precoce e ou preciso da doença. A orientação mundial e atual da Organização Mundial da Saúde (OMS) determina a procura de um biomarcador com considerável sensibilidade e especificidade para o estágio mais precoce da doença, estágio esse que abranja a fase de transição entre envelhecimento normal e o surgimento dos primeiros sintomas da DA, conhecido como declínio cognitivo leve (ARGENTIERI et al., 2017; SHAW et al., 2009; ZETTERBERG, 2017).

## 2.7 Hipóteses para a doença de Alzheimer

Algumas modificações e ou alterações bioquímicas são continuamente observadas na DA, como, por exemplo, a liberação de espécies reativas de oxigênio no cérebro, oligomerização do peptídeo A $\beta$ , hiperfosforilação da proteína tau, alterações em vias como a do folato, neuroinflamação, metabolismo errôneo de lípidos e glicídios, insuficiência e distribuição alterada das mitocôndrias, toxicidade sináptica e problemas na homeostase metálica (BAGYINSZKY et al., 2017).

Porém, duas características neuropatológicas são vistas de forma expressiva e reiteradamente em pacientes com DA. A primeira delas são as placas neuríticas, compostas primariamente de agregados filamentosos da proteína  $\beta$ -amilóide (A $\beta$ ) (HENRY; QUERFURTH; LAFERLA, 2010; MASTERS et al., 1985) e a segunda são os emaranhados neurofibrilares compostos principalmente pela hiperfosforilação da proteína tau (GRUNDKE-IQBAL et al., 1986; LIPPENS et al., 2007). Para tanto hipóteses tem sido criadas e difundidas para explicar a formação das placas beta amiloides ao longo dos anos na tentativa de explicar quais eventos seriam realmente os causadores da DA.

### 2.7.1 Hipótese da Cascata Amilóide

A Hipótese da Cascata Amilóide (HCA) é uma das hipóteses mais antiga e mais difundida relacionando a DA (HARDY; HIGGINS, 1992). Seu maior embasamento vem da combinação e integração da fisiopatologia do cérebro do indivíduo acometido pela doença e a genética humana (Figura 6). As origens da HCA residem na sequência de aminoácidos da Proteína Precursora Amiloide (APP) que foi analisada inicialmente de amostras de sangue de pacientes com DA e de indivíduos com síndrome de Down por Glenner e Wong, (1984) e, em seguida, de parênquima cerebral por Masters et al. (1985), colhidos *pós-mortem* de cérebros de pacientes com DA.

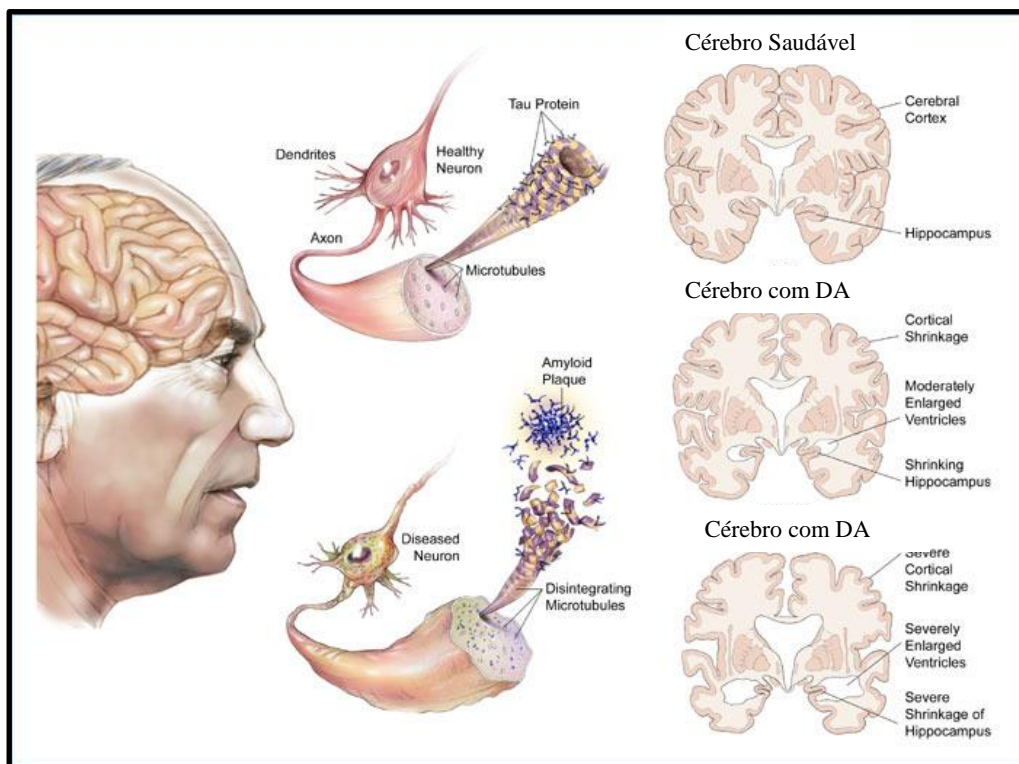


Figura 6: Agregação da proteína tau e da  $\beta$ -amilóide no sistema nervoso (Adaptado de: MORREALE, 2007)

Esses aminoácidos juntamente com a proteína tau, podem levar à formação das placas neuríticas e emaranhados neurofibrilares, essas características já haviam sido vistas por Alois Alzheimer em cérebros de indivíduos acometidos pela doença, mas esse não soube precisar quais seriam os componentes dessas características marcantes. Isto conduziu à identificação e sequenciação do gene da *Proteína Precursora Amilóide (APP)* (KANG et



al., 1987). Esse gene codifica a holoproteína a partir da qual o peptídeo A $\beta$  é excisado pela ação sequencial da enzima de clivagem  $\beta$ -amilóide. De acordo com a enzima que é secretada, o processamento da APP pode seguir duas vias diferentes e uma dessas vias induz a formação das placas A $\beta$  (PARVATHY et al., 1999; SINHA et al., 1999; VASSAR et al., 1999; YAN et al., 1999). A proteólise da APP é mediada por uma série de enzimas secretases, sendo elas:  $\alpha$ ,  $\beta$ , e  $\gamma$ . A atividade da  $\alpha$ -secretase eleva o metabolismo da APP, com diminuição na produção amilóide, ocorrendo a produção de peptídeos com 40 aminoácidos (A $\beta_{1-40}$ ), essa é a via de proteção, que promove a manutenção da célula sadia nervosa (DE STROOPER; IWATSUBO; WOLFE, 2012; HAASS et al., 1992; SELKOE, 1996).

Em contrapartida ao metabolismo realizado pela  $\alpha$ -secretase, no cérebro de pessoas com DA a proteólise é realizada em sua maioria pela enzima  $\beta$ -secretase originando fragmentos do peptídeo amilóide (A $\beta_{1-42}$ ), e este por sua vez são metabolizados, provavelmente pela via lisossomal/endosomal utilizada também pela  $\gamma$ -secretase (GANDY, 2005; LORENZO; YANKNER, 1994), essa seria a via mais prejudicial, por formar as placas senis. Denomina-se  $\beta$ -amiloide, peptídeos maiores, que diferem do anterior pelo acréscimo de 1 a 3 aminoácidos em seu comprimento, (geralmente 42 aminoácidos). Apresentam maior capacidade de agregação e são neurotóxicos, portanto, patogênicos (LIU et al., 2013) (Figura 7). Esse fragmento é tóxico e insolúvel no sistema nervoso, esses compostos reagem e interagem de forma nociva com receptores de células vizinhas, lesando a sinapse e sua funcionalidade (KUNG, 2012).

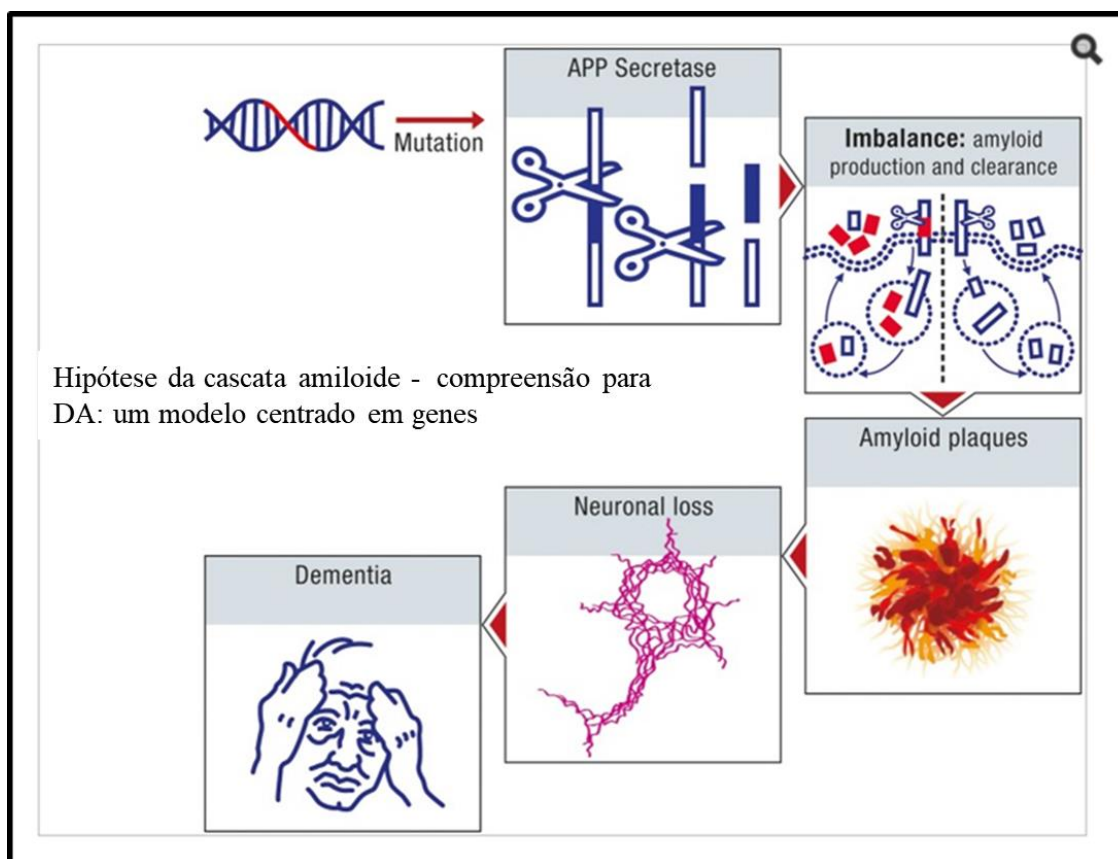


Figura 7: Hipótese da Cascata Amilóide: um modelo onde genes atuam de forma central no acometimento da DA. (Adaptado de: DEMETRIUS; MAGISTRETTI; PELLERIN, 2014)

Ainda que o acúmulo de origem amilóide (peptídeo A $\beta$ ) também seja encontrado em cérebros de idosos saudáveis a formação deste tipo de peptídeo é considerada um marco na patogênese da DA pois ocorre de forma excessiva nos pacientes e apenas em pequenas quantidades em indivíduos saudáveis (SMITH, 1999).

Além das placas senis, a segunda característica marcante na fisiopatologia da DA são os emaranhados neurofibrilares intraneuronais (Figura 8). Esses, foram produzidos comprovadamente, após ensaios imunocitoquímicos e bioquímicos, pela agregação da proteína tau hiperfosforilada. Encontrada associada aos microtúbulos, é a principal ou, mais possivelmente, a única subunidade desses emaranhados, e são notavelmente vistas em uma série de neurites distróficas e observadas no córtex de pacientes com DA (SELKOE, 1996; SELKOE; MANDELKOW; HOLTZMAN, 2012; WISCHIK et al., 1988).

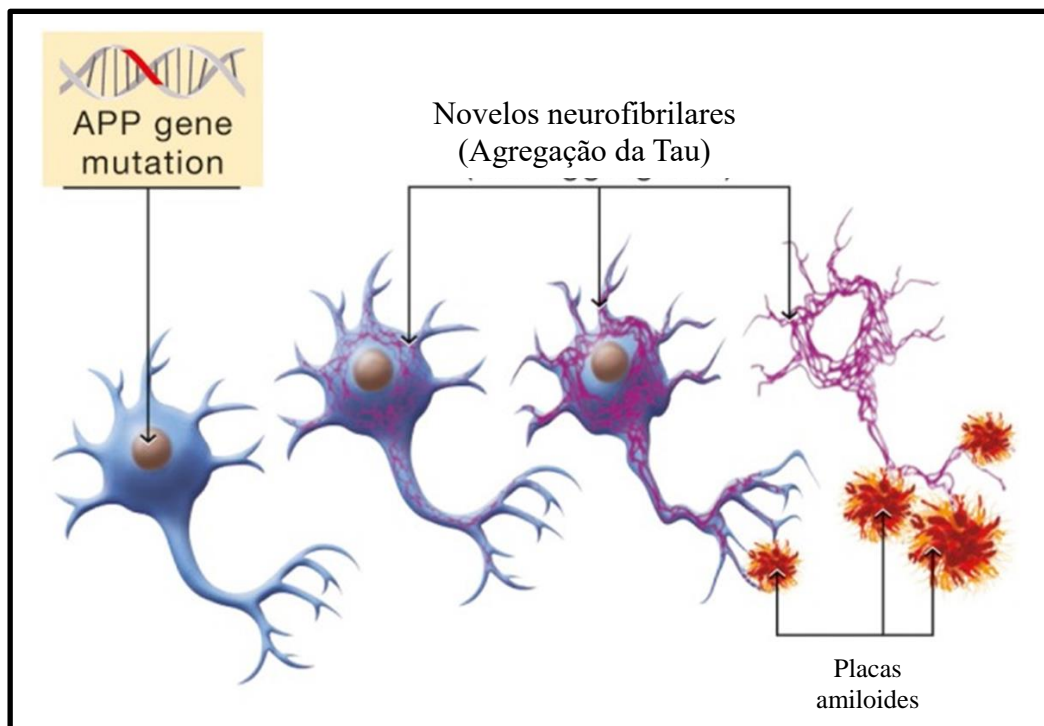


Figura 8: Mecanismos celulares envolvendo a hipótese da Cascata Amiloide – formação das placas amiloides e dos agregados da proteína tau (Adaptado de: DEMETRIUS; MAGISTRETTI; PELLERIN, 2014).

A hipótese de cascata amiloide postula que a deposição do peptídeo  $\beta$ -amiloide no parênquima cerebral e a hiperfosforilação da proteína tau são passos cruciais que levam, em última instância, à doença de Alzheimer (KARRAN; MERCKEN; DE STROOPER, 2011)

### 2.7.2 Hipótese da Cascata Mitocondrial (HCM)

A hipótese da cascata mitocondrial (HCM) descreve alterações mitocondriais relacionadas à longevidade podendo levar à diversas patologias e aos sintomas e características vistos e relatados por pacientes com a DA (SWERDLOW; BURNS; KHAN, 2014; SWERDLOW; KHAN, 2004) (Figura 9).

Em 2004, Swerdlow apresentou a hipótese da Cascata Mitocondrial para a origem e o acentamento da DA. As mitocôndrias são organelas fundamentais para o funcionamento celular. Elas têm função na produção de energia, manutenção do nível homeostático de EROs e de cálcio, além de coordenar a morte celular por apoptose. Hoje

já é aceito que disfunções mitocondriais possuem um papel significativo nas formas tardias esporádicas da DA. De acordo com esse mesmo autor, com a idade avançada, as funções mitocondriais sofrem uma redução, até atingirem um limiar mínimo de funcionamento. Além desse limiar, ocorreriam alterações mitocondriais referentes aos processos respiratórios, estresse oxidativo e às trocas enzimáticas. Esta seria uma das propostas da DA ser mais frequente com o avanço da idade - um mecanismo epigenético com mutações pontuais em decorrência do tempo de vida.

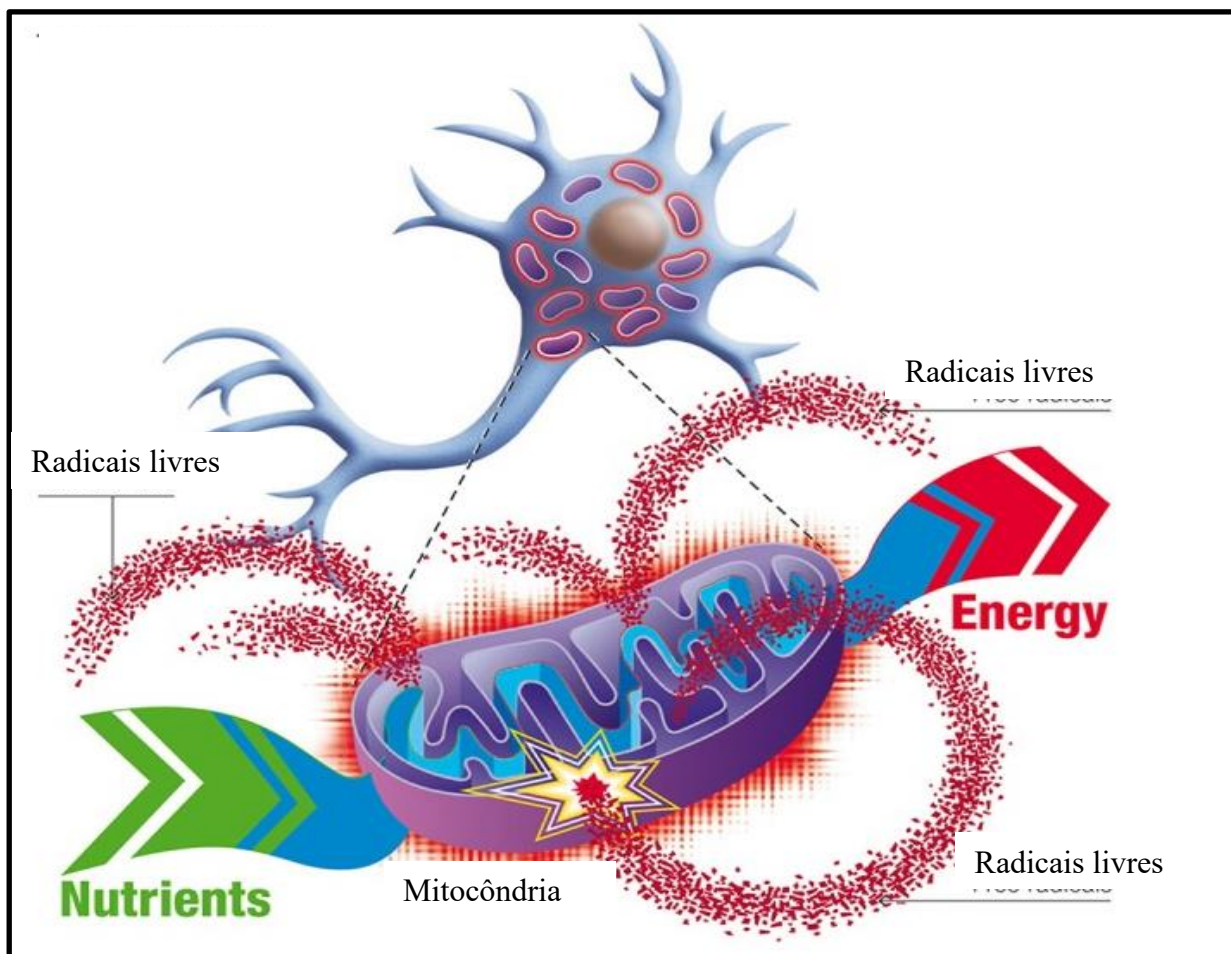


Figura 9: Alterações na eficiência energética neuronal durante o envelhecimento normal. Os neurônios dependem fortemente do metabolismo oxidativo para obter sua energia a partir dos nutrientes, e este processo ocorre na mitocôndria (Adaptada de: DEMETRIUS; MAGISTRETTI; PELLERIN, 2014).

Com a passar dos anos, naturalmente ocorrem lesões oxidativas no DNA mitocondrial (mDNA), além de falhas na remoção de proteínas, o que poderia estar associado com os mecanismos observados na forma esporádica da doença. Sob circunstâncias habituais, as mitocôndrias que atuam em funções neuronais necessitam de recursos fornecidos pelos

astrócitos. A própria disfunção mitocondrial promove o acúmulo de proteína amiloide no cérebro (LIN; BEAL, 2006).

Existem também evidências de que o comprometimento mitocondrial afetaria a neurogênese hipocampal (SWERDLOW; BURNS; KHAN, 2014) - antes, acreditava-se que a neurogênese ocorria apenas no desenvolvimento do cérebro e não que ela continuava durante toda a vida. Contudo estudos realizados recentemente concluíram que a neurogênese ocorre continuamente em conjunto com o processo inflamatório que ocorre na DA. A relação mitocondrial na DA pode estar conectada com mutações ou polimorfismos do mDNA ou ainda pelo desencadeamento de eventos bioquímicos que afetam a bioenergética celular e a homeostasia (JACK et al., 2012; SONNEN et al., 2008).

Porém a HCM não responde a algumas questões-chave. Apesar dos estudos de associação de genoma (GWAS), não foram encontrados genes que codificam proteínas mitocondriais ou proteínas envolvidas em bioenergética e a DA (LAMBERT et al., 2013). Algumas das evidências que apoiam a HCM provêm de sistemas biológicos celulares que são significativamente manipulados (sistemas *in vitro*) e podem não refletir a situação real da fisiopatologia humana. (CHÁVEZ-GUTIÉRREZ et al., 2012; SZARUGA et al., 2015).

Um dos princípios da HCM, seria que a DA é em grande parte uma doença do envelhecimento, porém essa afirmação também pode ser questionada em vários níveis. Por exemplo, nenhum dos genes que causam DAF é conhecido por desempenhar um papel no envelhecimento, e nenhuma das mutações que provoca progerias - doença caracterizada pelo envelhecimento precoce da criança - resulta em patologia acelerada da DA (NELSON et al., 2011). Essa hipótese portanto, não responde questões chave para o surgimento da DA, necessitando de mais pesquisas e novas abordagens.

### **2.7.3 Hipótese Metabólica**

A respeito do metabolismo, o cérebro humano, é um dos órgãos mais dinâmicos do corpo, processando uma grande quantidade de carboidratos para produzir energia celular na forma de adenosina trifosfato (ATP). Entretanto, mesmo com essa alta exigência de energia, esse órgão é desprovido de variabilidades no que tange a obtenção de substratos

para fabricação desta energia, utilizando quase que, tão somente, a glicose (SZABLEWSKI, 2017). Essa subordinação afeta o cérebro, pois se a distribuição do substrato for insuficiente ou interrompida, ou ainda eventualmente a capacidade de metabolizar a glicose se torne omissa, o cérebro fica incapacitado de preservar as sinapses cerebrais. Neste cenário, as células podem funcionar de maneira errônea, ocasionando alterações cognitivas prejudiciais.

Tendo em vista esse princípio, torna-se clara uma possível ligação entre doenças relacionadas a glicose (como a diabetes e hipo e hiper glicemia) e a DA (FERREIRA et al., 2014; LOURENCO; FERREIRA; DE FELICE, 2015).

A Hipótese Metabólica propõe que a causa fundamental para DA seja o hipometabolismo cerebral da glicose. Para investigar este fenômeno, os pesquisadores Lannert e Hoyer (1998) desenvolveram uma injeção de estreptozotocina (glicosamina-nitrosureia, amplamente utilizado para produzir o diabetes causando a destruição de células pancreáticas em ratos para produzir um estado diabético insulino-dependente) que era injetada nos cérebros do modelo animal. Isto resultou na diminuição da concentração glicose/energia no metabolismo cerebral, junto a esses resultados houveram também deficits de aprendizado e memória nesses modelos. Desde essas primeiras abordagens experimentais, um número significativo de evidências tem aumentado mostrando que de fato a sinalização da insulina no cérebro é significativamente prejudicada por esse estado de diminuição da concentração glicose/energia (PARK et al., 2000).

Porém ainda hoje é difícil extrapolar as conclusões das experiências realizadas com ratos e a estreptozotocina e as relacionar com a DA em humanos. Existe ainda pouca validade nesses dados, pois o mecanismo de ação da toxina não é altamente específico. O papel da proteína A $\beta$  para provocar anomalias de sinalização da insulina é bastante fraco, principalmente porque o papel da A $\beta$  e o metabolismo de glicose é controverso para alguns autores (BENILOVA; KARRAN; DE STROOPER, 2012). É difícil atribuir um papel primário das anomalias e da sinalização da insulina na causa da doença, uma vez que atualmente não existem dados de estudos de GWAS para apoiar tal mecanismo (LAMBERT et al., 2013) e os dados que colocam essas anomalias na via de sinalização da insulina juntamente com a hiperfosforilação da proteína tau e a clivagem incorreta da APP e conseqüentemente a formação de emaranhados neurofibrilares e placas senis ainda não são convincentes (DE FELICE; LOURENCO; FERREIRA, 2014).

No entanto, pode ser que as vias de sinalização da insulina sejam afetadas de forma adversa devido ao próprio processo da doença e, em geral, esta hipótese tem mérito, pois fornece várias hipóteses e vias para a intervenção terapêutica e medicamentosa (BOMFIM et al., 2012; TALBOT et al., 2012).

#### 2.7.4 Hipótese Vascular

A hipótese vascular (HV) foi originalmente baseada nas observações neuropatológicas de que, o cérebro de uma pessoa com DA possui um sistema vascular altamente capilarizado, porém essa rede de vasos encontra-se de forma desorganizada, confusa e reduzida (DE LA TORRE; MUSSIVAN, 1993; FISCHER; SIDDIQI; YUSUFALY, 1990). Existe atualmente um conjunto significativo de evidências que sustentam o importante papel do sistema vascular no cérebro de um indivíduo com DA (DE LA TORRE, 2004; MARCHESI, 2011) (Figura 10).

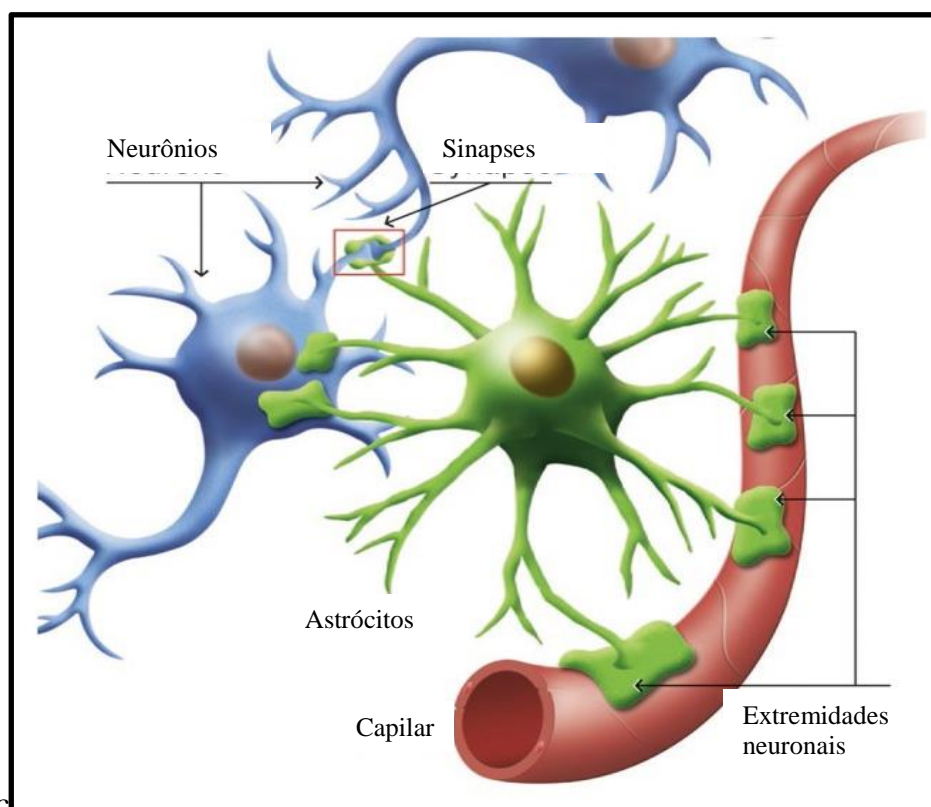


Figura 10: Relações citoarquitetônicas dos astrócitos. Os astrócitos, em verde, estão em contato com os vasos sanguíneos cerebrais, assim como os capilares, em marrom, através de suas extremidades neuronais. Além disso, os astrócitos atuam em outros processos em neurônios

vizinhos, em azul, mas que também envolve sinapses (Adaptada de: DEMETRIUS; MAGISTRETTI; PELLERIN, 2014).

Alguns dos fatores de risco conhecidos para DA incluem hipertensão na meia-idade (após os 55 anos) e diabetes em longevos, ambos com morbidades vasculares significativas (PRINCE, 2014). Um estudo sobre a localização de placas amilóides em um grande número de enfermidades demenciais (doença de Alzheimer, doença de Pick, síndrome de Down, demência pugilística e doença priónica) revelaram reduções significativas na microvasculatura de vasos sanguíneos e conseqüentemente o surgimento de placas neuríticas (BUÉE et al., 1994).

Este último aspecto foi pesquisado mais profundamente e a co-localização de depósitos ricos em hemoglobina, placas amiloides e vasos sanguíneos foram visualizadas nos cérebros de indivíduos com DA e com síndrome de Down (CULLEN; KÓCSI; STONE, 2006). Realizou-se uma minuciosa investigação desta relação utilizando os modelos de camundongos transgênico TG2576 e PSAPP, esses modelos desenvolveram uma forma de deposição de A $\beta$  parenquimatoso (KUMAR-SINGH et al., 2005). Esses estudos revelaram que cerca de 85% a 95% das placas neuríticas estavam centradas sobre ou próximas às paredes dos vasos vasculares, mostrando assim, mais uma vez a grande importância dessa hipótese e sua relação com doenças neurodegenerativas. O mesmo resultado não foi observado para os emaranhados neurofibrilares.

No entanto, em ambos os modelos de animais estudados, a composição das placas A $\beta$  é dominada pelas espécies A $\beta$ <sub>40</sub>, ao contrário das placas visualizadas na DA em humanos que são produzidas predominantemente pela deposição da A $\beta$ <sub>42</sub> (WELANDER et al., 2009). A $\beta$ <sub>40</sub> é mais solúvel do que o A $\beta$ <sub>42</sub> e mais susceptível de ser transportada para a vasculatura através do fluxo intersticial em massa. No entanto, esses estudos não podem confirmar uma relação temporal, se as placas amiloides resultam em dano vascular, ou danos vasculares é que na verdade resultam em placas, os cientistas que estudam essa teoria dizem precisar de mais dados e mais estudos específicos para elucidar essa hipótese (DE FELICE; LOURENCO; FERREIRA, 2014; M DE LA MONTE, 2012).

### **2.7.5 Hipótese Metálica**



Ao longo dos anos, houve um aumento no interesse sobre a contribuição de metais essenciais para processos fisiopatológicos de doenças neurodegenerativas (BJORKLUND; SADAGOPARAMANUJAM; TAGLIALATELA, 2012; ZECCA et al., 2004). Um desequilíbrio na homeostase metálica é cogitado por desempenhar um papel importante na progressão de doenças neurodegenerativas, como a DA (CRESPO et al., 2014).

Estudos apontam que alguns íons metálicos endógenos, especialmente os que possuem atividade redox, tais como cobre(II) e ferro(III), além de certos íons não redox-ativos, como o zinco(II) e o alumínio, consumidos na alimentação e na ingestão de água onde se apresentam na forma mais biodisponível para serem absorvidos pelo intestino (MARTYN et al., 1997), podem contribuir na evolução e acometimento de doenças neurodegenerativas, auxiliando a formação, manutenção, e maior toxicidade das placas senis na DA (GREENOUGH; CAMAKARIS; BUSH, 2013; NABUURS et al., 2013).

Constatou-se que, tanto o cobre quanto o zinco propiciam um aumento na velocidade de agregação do peptídeo A $\beta$  sintético em meio aquoso, (MIURA et al., 2000) isso ocorre provavelmente por causa da ligação aos resíduos de histidina do mesmo, (FALLER; HUREAU, 2012) e esses resíduos encontram-se anormalmente distribuídos em pacientes com DA, especialmente no hipocampo e nas amídalas, no interior do núcleo e nas áreas periféricas das placas neuríticas (SAYRE et al., 2000). Estes biometais estimulam o aumento do estresse oxidativo no cérebro, pois estimulam a produção de EROs, como os radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio, além das espécies reativas de nitrogênio (ERNs), como o óxido nítrico, EROs e ERNs tem o poder de causar extensos danos celulares.

Seus produtos, são substancialmente instáveis e podem reagir com DNA, proteínas e lipídeos. Por exemplo, a oxidação errônea do ferro gera anormalidades no RNA, que, na DA, é especialmente afetado, causando grave redução na síntese protéica, (ZHU et al., 2007) enquanto o radical hidroxila ocasiona inúmeras anomalias às biomoléculas acometendo as bases nitrogenadas e a desoxirribose do DNA, podendo reagir com as cadeias laterais de aminoácidos e proteínas - o que seria capaz de gerar fragmentos protéicos não funcionais - e também com lipídeos de membrana, modificando sítios

lipídicos específicos em novos centros de formação de radicais livres (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Embora uma associação direta não tenha sido demonstrada entre a exposição a metais e a doença de Alzheimer, acredita-se que um déficit relacionado à doença na remoção de metais do cérebro resulte em uma carga metálica elevada e produza efeitos adversos (DUCE et al., 2010; GREENOUGH et al., 2011).

## 2.8 Caracterização dos genes investigados

Genes como *APOE* (*Apolipoprotein E*), *MTHFD1L* (Methylenetetrahydrofolate Dehydrogenase (NADP+ Dependent) 1-Like), *SERPINA3* (*Alpha-1 Antiproteinase, Antitrypsin*), *FOXO3* (*Forkhead box O3*), *SIRT1* (*Silent Information Regulator Type 1*) e *SOD2* (*Superoxide dismutase 2*), têm sido descritos como moduladores do tempo de vida relacionados ao surgimento ou acometimento com doenças neurodegenerativas e/ou demenciais, como é o caso da doença de Alzheimer, estão envolvidos em vias do metabolismo de lipídeos, carboidratos, folato, inflamação e com a resposta ao estresse oxidativo (BARZILAI et al., 2012; DATO et al., 2013).

### 2.8.1 APOE

*APOE* é o principal marcador genético para a doença de Alzheimer Esporádica, mas foi também identificado por apresentar uma associação com a forma dominante autossômica de início precoce da DA (AN et al., 2016; CORDER et al., 1993). O gene que codifica, *APOE*, é polimórfico e está localizado no cromossomo 19q13.2. (DAS et al., 1985). A combinação de dois polimorfismos de nucleotídeo único, rs429358 e rs7412, no éxon 4, e suas respectivas diferenças nos resíduos dos aminoácidos 112 e 158, definem três isoformas para *APOE*:  $\epsilon 2$ , com resíduos de cisteínas em ambos os sítios (cis112, cis158);  $\epsilon 3$ , com cisteína e arginina (cis112, arg158) e  $\epsilon 4$ , com resíduos de arginina nas duas posições (arg112, arg158) (Figura 11).

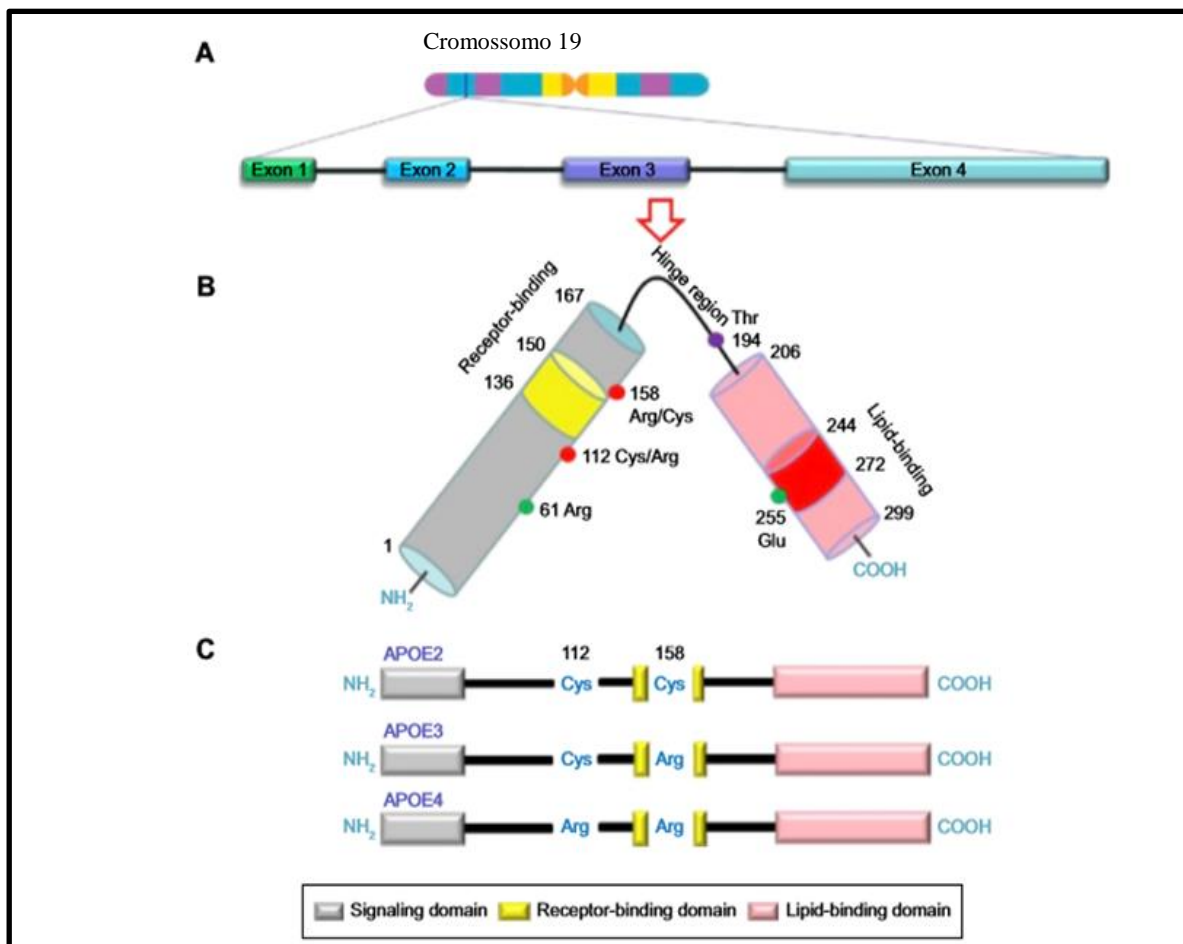


Figura 11: Ilustração esquemática de regiões estruturais e funcionais de ApoE; (A) Localização e estrutura do gene *ApoE* no cromossomo 19; (B) A proteína ApoE é uma cadeia polipeptídica com 299 aminoácidos. Consiste numa região de ligação ao receptor (resíduos 136-150) no domínio N-terminal (resíduos 1-167) e uma região de ligação de lipídios (resíduos 244-272) no domínio C-terminal (resíduos 206-299); (C) Três principais isoformas de ApoE estão localizadas nos resíduos 112 e 158, na figura mostrada pelos círculos vermelhos, onde ApoE $\epsilon$ 2 tem resíduos Cys em ambas as posições, ApoE  $\epsilon$ 3 tem um resíduo Cys em 112 e um resíduo Arg em 158 e ApoE  $\epsilon$ 4 tem resíduos Arg em ambas as posições (Adaptado de: VAN GIAU et al., 2015).

A *Apolipoproteína E* (*ApoE*) é uma glicoproteína de 34KDa, que exerce papel relevante na homeostase lipídica no cérebro e tecidos periféricos (MAHLEY, 1988), em 1994 o genótipo *ApoE* $\epsilon$ 4 foi descrito pela primeira vez como um importante fator de risco para DA (STRITTMATTER et al., 1994). Essa proteína participa do transporte e redistribuição do colesterol, sendo sintetizada predominantemente pelo fígado. A figura 12 mostra o descrito de forma esquemática. Considerando essas isoformas, seis possíveis diplótipos são observados,  $\epsilon$ 2/ $\epsilon$ 2,  $\epsilon$ 2/ $\epsilon$ 3,  $\epsilon$ 2/ $\epsilon$ 4,  $\epsilon$ 3/ $\epsilon$ 3,  $\epsilon$ 3/ $\epsilon$ 4 e  $\epsilon$ 4/ $\epsilon$ 4 (ZHONG et al., 2016). O alelo  $\epsilon$ 4 é reconhecido mundialmente como um fator de predisposição e risco para a doença. O

alelo  $\epsilon 2$  é o menos encontrado na maioria das populações, sendo considerado o alelo raro, e para algumas pesquisas seria fator de proteção (CORDER et al., 1994; ROYSTON et al., 1994). Enquanto o alelo  $\epsilon 3$  continua a ser uma dúvida quanto à sua participação na doença, se seria um alelo neutro ou de proteção (FLEMING et al., 1996; STRITTMATTER et al., 1994). Esse é o alelo encontrado de forma mais predominante nas diversas populações, a distribuição populacional de  $\epsilon 3$ ,  $\epsilon 4$  e  $\epsilon 2$ , em torno do mundo, é de cerca de 77,9%, 13,7% e 8,4%, respectivamente (CHRISTENSEN; JOHNSON; VAUPEL, 2006; MENZEL; KLADETZKY; ASSMANN, 1983), e esses dados são constantemente reafirmados em pesquisas que utilizam o GWAS (GIRI; ZHANG; LÜ, 2016).

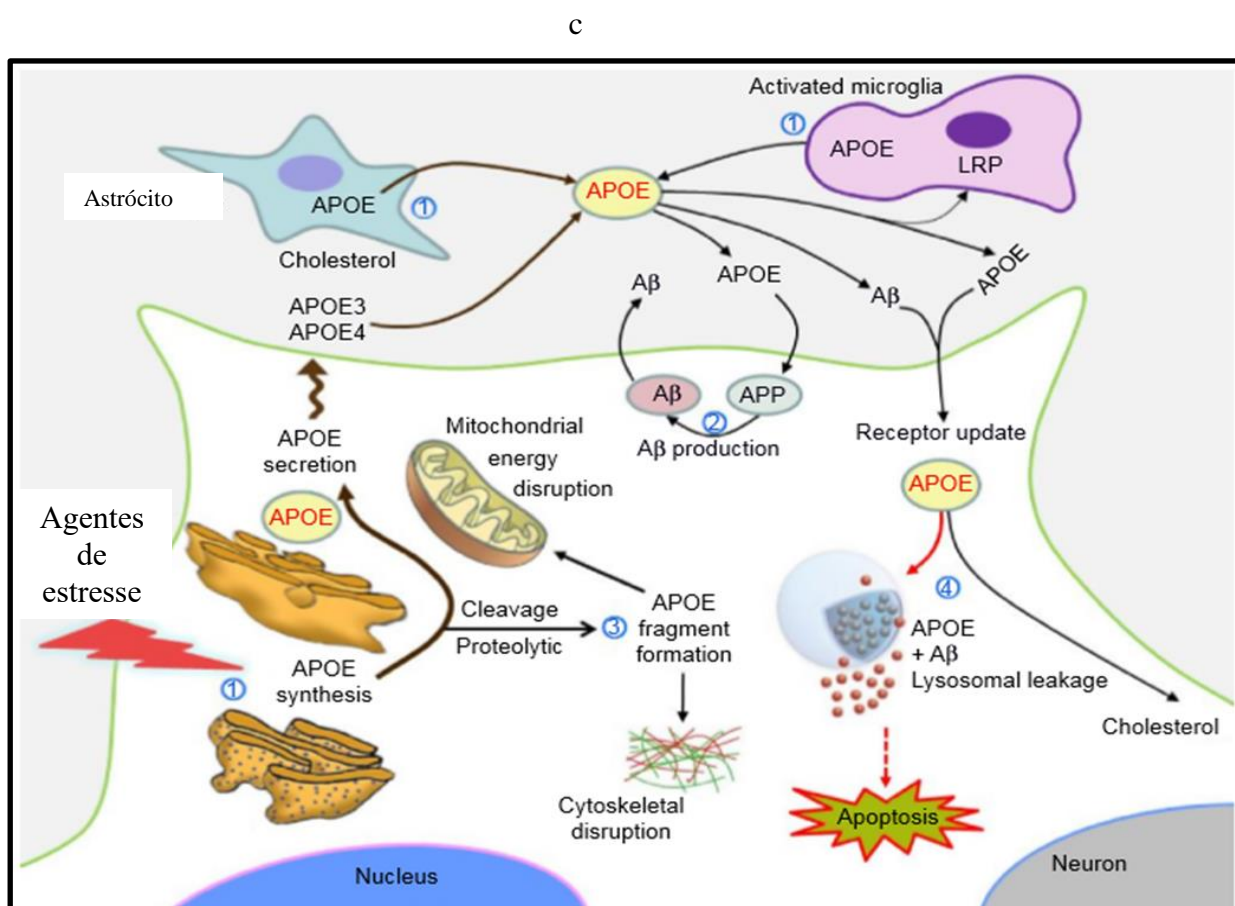


Figura 12: Formação de ApoE e seu papel na redistribuição de lipídios para as células do Sistema Nervoso Central: os efeitos neuropatológicos dos fragmentos de ApoE neurotóxicos (VAN GIAU et al., 2015).

Essas variantes e, por conseguinte, as diferenças entre os aminoácidos cisteína e arginina alteram a estrutura da ApoE, e sua função: ApoE $\epsilon 2$  e ApoE $\epsilon 3$  ligam-se,

preferencialmente, à lipoproteína de alta densidade (HDL-c), enquanto que ApoE $\epsilon$ 4, adere às lipoproteínas de baixa (LDL-c) e muito baixa densidade (VLDL-c) (Adaptado de: SAITO et al., 2003).

A presença do resíduo de cisteína na ApoE $\epsilon$ 2, na posição 158, causa um rearranjo na ligação existente entre arg154-arg158, substituindo arg158 por arg150, o que muda o potencial de ligação da proteína a receptores de lipoproteínas (MAHLEY; HUANG; RALL, 1999). Por outro lado, em ApoE $\epsilon$ 4, a substituição de cisteína por arginina na posição 112 acarreta uma interação entre arginina e glutamina, nas posições 61 e 255, respectivamente, em meio aquoso, culminando em domínios de ligação a receptores na proteína ApoE inexistentes nas isoformas  $\epsilon$ 2 e  $\epsilon$ 3 (ZHONG; WEISGRABER, 2009). Por sua vez, essas alterações tornam a estrutura de  $\epsilon$ 4 mais compacta e com regiões menos estáveis e protegidas em relação a  $\epsilon$ 3 (NATHAN et al., 1994). Com isso, ApoE $\epsilon$ 2 e  $\epsilon$ 4 apresentam perfis de ligação a receptores que favorecem hipocolesterolêmia e hiperlipidemia, respectivamente (MAHLEY; RALL JR, 2000).

Estas isoformas codificam uma proteína de relevância para manutenção e reparação de neurônios, mas essas três isoformas diferem em suas habilidades para realizar tarefas críticas, mostrando influência em processos como o de metabolismo lipídico e glicídico, transporte de lípidos cerebrais, sinalização neuronal, neuroinflamação e função mitocondrial (MAHLEY, 1988; VAN GIAU et al., 2015).

### 2.8.2 MTHFD1L

O gene *MTHFD1L* localizado no cromossomo 6q25.1, codifica a proteína metilenotetrahidrofolato desidrogenase dependente de NDP (+). Essa enzima está envolvida na síntese de tetrahidrofolato (THF), catalisando a síntese reversível do 10-formil-THF para formação de novo THF, esse é um passo importante na conversão de homocisteína em metionina (PIKE et al., 2010). Níveis elevados de homocisteína no plasma têm sido correlacionados com a DA (VAN DAM; VAN GOOL, 2009) e com outras doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson (HERRMANN; KNAPP, 2001), e já é reconhecido como um fator de risco para complicações diabéticas e doenças cardíacas (ARNESEN et al., 1995).

Seshadri et al. (2002), avaliaram que altos níveis de homocisteína são fator de risco para demências e para doença de Alzheimer. O resultado desse estudo foi que o risco relativo para desenvolver diversos tipos de demência e dentre essas a DA foi amplamente maior para aqueles indivíduos que apresentam níveis plasmáticos de homocisteína superiores ao considerado normal bioquimicamente. Essa pesquisa ratifica outros estudos evidenciando dessa forma, que altos níveis de homocisteína plasmática estariam amplamente envolvidos e de forma independente a outros fatores no desenvolvimento e estabelecimento da DA (SHEA; LYONS-WEILER; ROGERS, 2002). Além disso, quantidades elevadas de homocisteína já foram correlacionadas com fraco desempenho cognitivo em idosos e parecem acentuar a formação das placas amiloides (TAGLIARI et al., 2006)

### 2.8.3 SERPINA3

Por ser uma doença de etiologia multifatorial, a DAE possui características de risco genético diferentes nas inúmeras populações mundiais (GATZ et al., 2006). Isso demonstra a crescente necessidade de se estudar grupos étnicos distintos na busca de polimorfismos de riscos, como é o caso da *SERPINA3*, anteriormente conhecido como: *alpha-1-antichymotrypsin (ACT)*.

*SERPINA3* é uma glicoproteína encontrada na região alfa-1 da globulina localizada no 14q32.13. É um marcador inflamatório bem estabelecido encontrado juntamente com a proteína A $\beta$  em placas senis (HAN et al., 2012), (KALSHEKER, 1996; SILVERMAN et al., 2001). Essa glicoproteína inibe as proteínas semelhantes à quimiotripsina *in vivo* e tem atividade citotóxica *in vitro*. O que torna a análise desse polimorfismo importante, é sua relação com o aumento do risco para DA encontrado em diversos estudos como, por exemplo, nos trabalhos de Ritchie; Morgan e Kalsheker (2004) e Han et al. (2012) essa enzima junto com A $\beta$  foi descrita por ser um dos maiores componentes das placas senis, que é um dos aspectos clássicos da DA (ABRAHAM; SELKOE; POTTER, 1988).

Uma série de estudos indicaram que *SERPINA3* possui afinidade específica para A $\beta$ <sub>42</sub>, promovendo a deposição de proteína amiloide solúvel na formação de filamentos

amiloides tóxicos, assim desempenha um papel direto na patogênese da DA (KAMBOH et al., 1995; WANG et al., 2002). Em ensaios clínicos realizados por Porcellini et al. (2008), foi verificado que em pacientes demenciados e com DA os níveis plasmáticos de SERPINA3 eram mais altos do que em indivíduos pareados em relação a idade e gênero e que não apresentavam qualquer sinal demencial, e que esse achado deveria ser usado como um biomarcador para auxiliar no diagnóstico precoce da doença.

#### **2.7.4 FOXO3**

O gene *FOXO3* (*Forkhead box O3A*), localizado no cromossomo 6q21, codifica o fator de transcrição multifuncional *forkhead box O3A*, que pertence à família das proteínas FOXO, FOXO1, FOXO4, FOXO6, conservadas evolutivamente, de *Caenorhabditis elegans* a mamíferos (LEE et al., 2003). FOXO3 está envolvida em processos como proliferação celular, apoptose, resposta ao estresse oxidativo, regulação do ciclo celular, metabolismo e longevidade (Figura 13) (TZIVION; DOBSON; RAMAKRISHNAN, 2011). Esse fator de transcrição é expresso em tecidos de resposta ao hormônio insulina, adipócitos, músculo esquelético, fígado, pâncreas e tem sido considerado um mediador chave na via de sinalização da insulina *IIS* (*Insulin/Igf1-like signaling*) (LAM; FRANCIS; PETKOVIC, 2006).

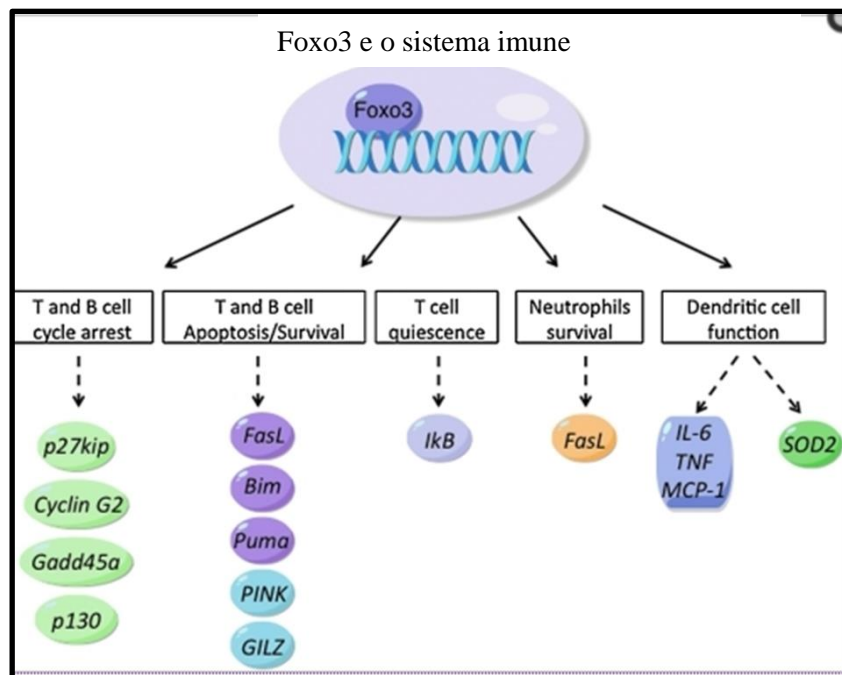


Figura 13: Funções dos fatores de transcrição Foxo3 no sistema imunológico. Os fatores de transcrição Foxo3 desencadeiam uma variedade de processos celulares através da regulação de genes alvo envolvidos na sobrevivência, proliferação e morte de células T e B, sobrevivência de neutrófilos e resistência ao estresse oxidativo (Adaptado de: DEJEAN; HEDRICK; KERDILES, 2011).

FOXO3 é altamente expresso no cérebro humano, especialmente em áreas vulneráveis a DA como é o caso do córtex frontal e o hipocampo (HOEKMAN et al., 2006). Alguns estudos *in vitro* utilizando tecidos cerebrais de pacientes com DA *post mortem* e modelos animais, confirmaram o envolvimento de FOXO3 na neurodegeneração e na formação das placas beta amiloides (FENG; MENG; XING, 2015; FERNANDEZ et al., 2012; PINO et al., 2013; SHI et al., 2016). Uma disfunção mitocondrial pode induzir a formação das placas A $\beta$  e gerar espécies reativas de oxigênio (ABRAMOV; CANEVARI; DUCHEN, 2004), o que culminaria em danos oxidativos, morte celular e FOXO3 ativado por placas A $\beta$ , participando da sinalização pró-apoptótica dos neurônios (ZHAO et al., 2013).

### 2.7.5 SIRT1

O envelhecimento e as desordens relacionadas ao metabolismo são fatores de risco para DA (MATTSON, 2003). Sirtuínas são proteínas codificadas pelo gene SIRT1 (*Silent*



*Information Regulator Type 1*) localizado no cromossomo 10q21.3 constituído de 11 exons. Podem aumentar o tempo de vida através da regulação do metabolismo celular sendo apontadas como possíveis fatores de proteção em relação a doença de Alzheimer (BORDONE; GUARENTE, 2005; JULIEN et al., 2009).

As sirtuínas identificadas em humanos constituem uma família de sete enzimas, as quais são evolutivamente unidas pela presença de um domínio catalítico, de ligação à nicotinamida adenina dinucleotídeo, verificado via atividade de desacetilase-NAD<sup>+</sup>, primariamente, no gene *SIR2* (*Silent Information Regulator 2*) de *Saccharomyces cerevisiae*, envolvido na extensão do tempo de vida desse organismo (FRYE, 2000; SMITH et al., 2000). *SIRT1* é o membro dessa família mais estudado por ser o homólogo mais próximo a Sir2 e pelo seu papel na regulação de processos metabólicos e do ciclo celular, na resposta ao estresse oxidativo e no envelhecimento (HALL et al., 2013; MICHAN; SINCLAIR, 2007).

*SIRT1* é uma das enzimas que controla o estado metabólico. Ela constitui uma ligação molecular essencial entre o envelhecimento e distúrbios degenerativos humanos (Figura 14). É compreensível então, que *SIRT1* seja regulada por vários fatores de estresse biológicos, tais como a restrição calórica, que foi demonstrado em diversas pesquisas por prevenir a DA (PASINETTI et al., 2007; WHITMER et al., 2007) e por condições neurotóxicas, eventos que podem ser interpretado como uma resposta de adaptação neuroprotetora contra a formação de EROs em relação a DA (JULIEN et al., 2009). Como *SIRT1* pode regular o envelhecimento e processos metabólicos envolvidos na patogênese da DA poderia, portanto, representar um potencial alvo terapêutico. Por conta disso, dessa conexão, sirtuínas e a DA têm sido amplamente estudadas, e recebido uma atenção maior por parte dos pesquisadores (ANEKONDA; REDDY, 2006; NUNOMURA et al., 2007; OUTEIRO; MARQUES; KAZANTSEV, 2008).

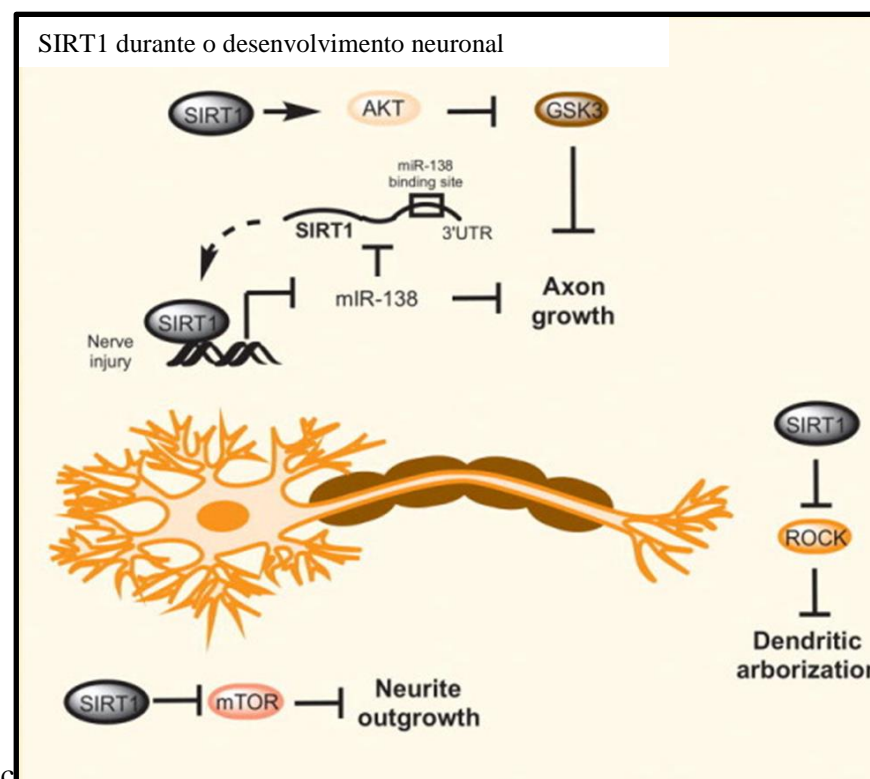


Figura 14: *SIRT1* no desenvolvimento neurológico e na senescência cerebral: O papel de *SIRT1* nas características estruturais das células neuronais (Adaptado de: HERSKOVITS; GUARENTE, 2014).

### 2.8.6 SOD2

Genes envolvidos em mecanismos celulares de reparo a danos oxidativos são fortes candidatos como fatores etiológicos para doença de Alzheimer (ORTIZ et al., 2017). Um desses genes envolvido neste mecanismo é o *Superóxido dismutase 2 (SOD2)*. O gene que codifica essa enzima encontra-se dentro de um único bloco do haplótipos no cromossomo 6q25.3, uma região que mostra evidência de relação com a DA em estudos de GWAS (WIENER et al., 2007).

*SOD2* são uma classe de enzimas que catalisam a conversão de ânions superóxidos ( $O_2^{\cdot-}$ ), uma espécie reativa de oxigênio, em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o qual, posteriormente, é convertido em água (HALLIWELL, 1978). Essas Espécies Reativas de Oxigênio são geradas, principalmente, durante o transporte de elétrons, na fosforilação oxidativa. As SODs exercem um papel importante em vias biológicas de oxi-redução, sendo cruciais na defesa endógena antioxidante, do sistema de sinalização que protege as

células e tecidos do estresse oxidativo, caracterizado por um aumento na produção de compostos reativos (NOZIK-GRAYCK; SULIMAN; PIANTADOSI, 2005).

## **2.9 Estresse Oxidativo e sua contribuição na doença de Alzheimer**

O estresse oxidativo é uma condição que representa um desbalanço entre a produção de EROs e a habilidade do corpo de detoxificar os intermediários reativos ou de reparar os danos resultantes desse processo (MUNIZ et al., 2008). Existe um número significativo de evidências que indicam que o dano oxidativo está envolvido no processo de envelhecimento e, em particular, em doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer (BEAL, 2004). O cérebro, com seu alto consumo de oxigênio, alto teor de lipídios facilmente oxidados e escassez de defesas antioxidantes, é particularmente suscetível a lesões e ao estresse oxidativo (Fig.15) (SMITH et al., 1996, 1998). Todos os níveis de metabolismo celular no cérebro de indivíduos com DA parecem ser mais afetados pelos danos causados pelos radicais livres do que no cérebro de pessoas com o envelhecimento normal (CHRISTEN, 2000; MARKESBERY, 1999). Existe um aumento do dano oxidativo aos ácidos nucleicos e uma disfunção mitocondrial nos cérebros acometidos pela DA (COSKUN; BEAL; WALLACE, 2004; MECOCCI; MACGARVEY; BEAL, 1994).

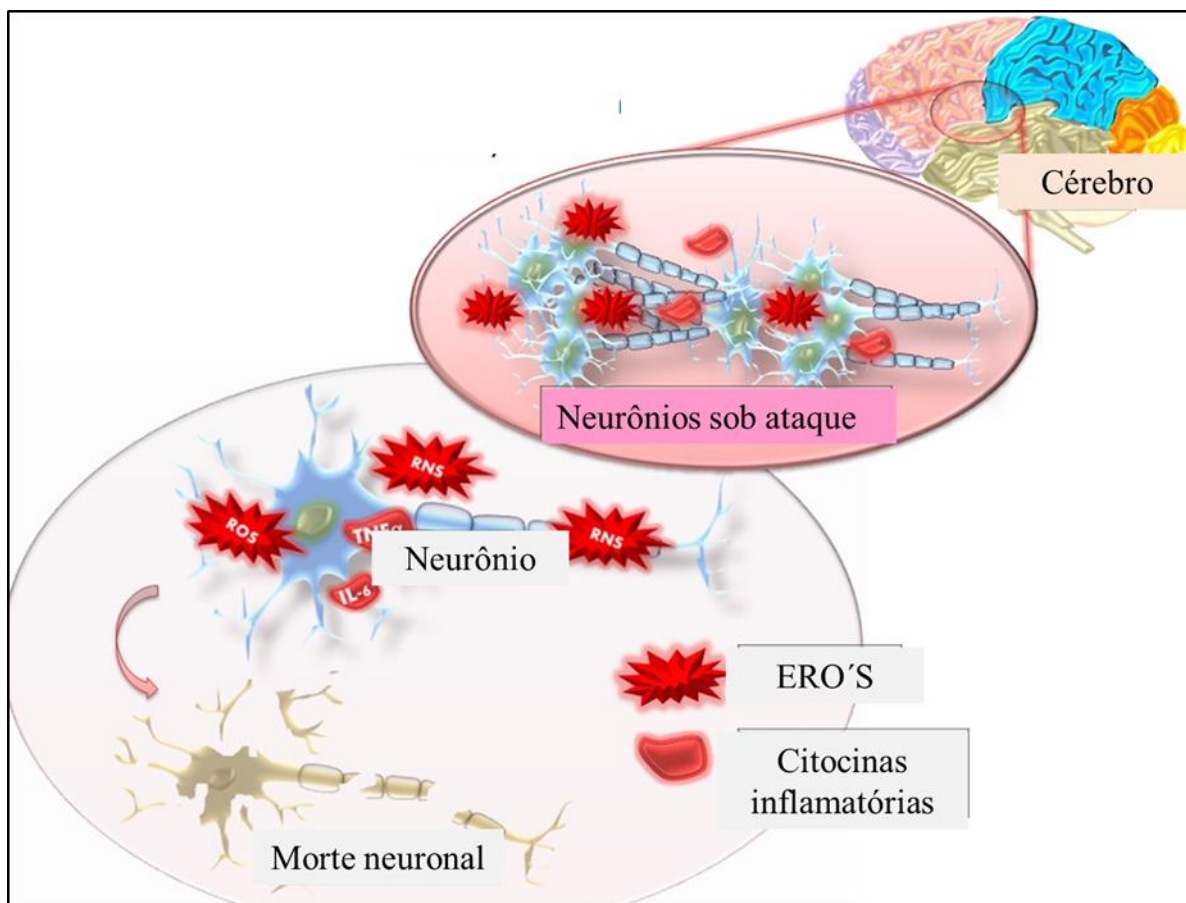


Figura 15: O estresse oxidativo e a inflamação podem danificar células nervosas a perda de células nervosas cerebrais pode causar a doença de Alzheimer.( Adaptada de: WAKE et al., 2013)

## 2.10. Perspectiva de Tratamentos

Até a presente data, não existe cura para a doença de Alzheimer. A evolução da medicina tem possibilitado que os pacientes tenham uma sobrevida e uma qualidade de vida melhores, mesmo na fase aguda da doença.

Uma das primeiras medicações testadas no mundo na tentativa de frear a DA foi a fisostigmina, há mais de 30 anos, que apesar de proporcionar melhora da memória e capacidade do indivíduo foi inutilizada por causar diversos efeitos colaterais. Já o primeiro fármaco utilizado em larga escala e aprovada por agências reguladoras, surgiu em 1993, esse medicamento tinha como nome comercial Tacrina. Entretanto, essa

medicação também caiu em desuso por conta de novas medicações que eram mais fáceis de lidar e tinham menos efeitos adversos.

Os medicamentos aprovados e utilizados no Brasil, são aqueles que atuam na via da acetilcolina sendo eles: a rivastigmina, a donepezila e a galantamina (conhecidas como inibidores da acetilcolinesterase ou anticolinesterásicos).

Contudo, novos estudos surgem na medida em que novas informações são repassadas. Uma das correntes para tratamento utilizadas atualmente é a: Estimulação Cerebral Profunda, realizada com eletrodos essa técnica aplica pulsos de eletricidade diretamente no cérebro. Essa pesquisa foi realizada no Canadá, já está em fase de teste e nas seis pessoas que receberam o tratamento duas tiveram uma melhora considerável, no que tange memória e aspectos cognitivos, a pesquisa continua na tentativa de estabelecer um padrão de tratamento (LAXTON et al., 2010; SANKAR et al., 2015).

Novas drogas também vêm sendo testadas ao longo dos anos, uma nova vacina está em fase de teste em macacos *rhesus*, uma vez que mostrou ser eficiente em ratos, a vacina de nome ADN A $\beta$ 4 foi administrada em seis macacos, e mostrou uma redução nas placas amiloides e poucos efeitos colaterais (LAMBRACHT-WASHINGTON et al., 2017). Uma outra vacina que ataca o acúmulo da proteína beta-amiloide, é feita com um anticorpo chamado de Aducanumab. Essa vacina já está em fase de teste em humanos na Europa e América do Norte. Sua resposta até a presente data em relação a degradação das placas senis foi positiva (SEVIGNY et al., 2016).

## 2.11 Potencial Biotecnológico

Assim, com intuito de buscar potenciais biomarcadores de diagnóstico complementar ou de prognóstico, este trabalho de pesquisa propôs avaliar polimorfismos de risco para doença de Alzheimer na população do Espírito Santo, com base em trabalhos anteriores que sugerem que polimorfismos nos genes *APOE*, *MTHFD1L*, *SERPINA3*, *SIRT1*, *FOXO3* e *SOD2* apresentam associação positiva com a doença de Alzheimer Esporádica. Além disso, os resultados gerados poderão compor um perfil genético de alelos associados com a doença para população capixaba. Estudos de diferentes populações são

importantes para identificar os alelos de risco e validar os potenciais biomarcadores para doença.

### **3. Objetivos**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Este projeto tem como objetivo identificar biomarcadores genéticos da doença de Alzheimer para os polimorfismos dos genes *APOE*, *MTHFD1L*, *SERPINA3*, *FOXO3*, *SIRT1* e *SOD2*.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar a associação de polimorfismos dos genes *APOE* (*rs429358* e *rs7412*), *MTHFD1L* (*rs11754661*), *SERPINA3* (*rs4934*), *FOXO3* (*rs2802292*), com enfoque na via do folato e da formação da placa beta amiloide em indivíduos controles e acometidos pela doença de Alzheimer.
  
- Verificar a associação dos polimorfismos *SOD2* (*rs4880*), e *SIRT1* (*rs2273773*) com o estresse oxidativo e danos genômicos em indivíduos sadios e acometidos pela doença de Alzheimer.

## 4. ARTIGOS CIENTÍFICOS DERIVADOS DA TESE

### 4.1 MANUSCRITO 1

O manuscrito intitulado “*Association study of MTHFD1L, SERPINA3, FOXO3 and APOE variants in Alzheimer disease*” foi submetido para avaliação ao periódico *Human Molecular Genetics*, de acordo com os critérios estipulados pelo Regimento do Programa de Pós-Graduação Renorbio.

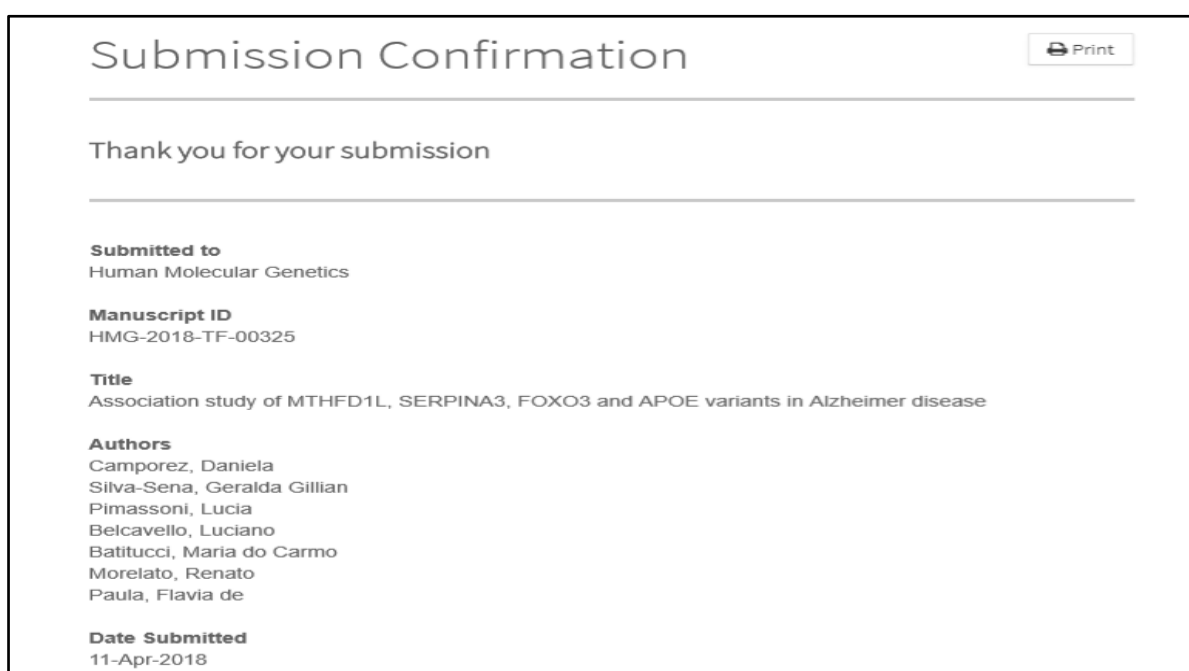


Figura 16: Comprovação da submissão do Manuscrito 1

Association study of *MTHFD1L*, *SERPINA3*, *FOXO3* and *APOE* variants in Alzheimer disease

Daniela Camporez<sup>1,2</sup>; Geralda G. Silva-Sena<sup>1,3</sup>; Lúcia H. S. Pimassoni<sup>4</sup>; Luciano Belcavello<sup>5</sup>; Maria do C. P. Batitucci<sup>2,6</sup>; Renato L. Morelato<sup>4,7</sup>; Flavia de Paula<sup>1,2</sup>

1. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Renorbio, Universidade Federal do Espírito Santo, CEP 29043-900, Vitória, ES, Brazil.
2. Departamento de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Humanas e Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo, CEP 29075-910, Vitória, ES, Brazil.
3. Departamento de Educação Integrada em Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, CEP 29043-900, Vitória, ES, Brazil.
4. Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória, CEP 29027-502, Vitória, ES, Brazil.
5. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, Viamão, RS, Brazil.
6. Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Centro de Ciências Humanas e Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo, CEP 29075-910, Vitória, ES, Brazil.
7. Hospital da Santa Casa de Misericórdia de Vitória, CEP 29025-023, Vitória, ES, Brazil.

---

\***Corresponding author:** Dr. Daniela Camporez, Núcleo de Genética Humana e Molecular, Departamento de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Humanas e Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Fernando Ferrari, N.514, Goiabeiras Prédio Bárbara Weinberg CEP 29075-910, Vitória, ES, Brazil. (55) 27-40092324 ramal 5324; E-mail address: [danielacamporez@gmail.com](mailto:danielacamporez@gmail.com)



**Abstract**

Alzheimer's disease (AD) is the most common type of age-related dementia and is caused by progressive degeneration of brain cells. AD is clinically characterized by memory loss and cognitive impairment. Although age is the main risk factor for developing AD, a complex interaction of environmental and genetic factors is arguably related to the risk of the disease. In this association study, we evaluated the relationships of polymorphisms in the genes *APOE* (rs429358 and rs7412), *MTHFD1L* (rs11754661), *SERPINA3* (rs4934) and *FOXO3* (rs2802292) as well as environmental factors, such as educational level and ethnicity, with the risk of AD in elderly individuals from southeastern Brazil. In our sample, *APOE* polymorphisms were found to be highly associated with disease, with the  $\epsilon 4$  and  $\epsilon 3$  alleles acting as risk and protective factors, respectively. Additionally, the GG (for *MTHFD1L*), GG, and AG (for *SERPINA3*) genotypes showed an association with AD. In contrast, *FOXO3* was not associated with the disease. Although there have been several studies addressing molecular aspects of AD, the understanding of this pathology is still incomplete. Thus, validation of genes involved in this etiology could help to elucidate pathways related to the disease. These results may be useful in the search for genetic biomarkers to identify individuals at risk of developing AD before dementia symptoms arise and to provide new insights related to future therapies, helping us to understand and respond to this disorder.

## 1. Introduction

Dementia is a brain disorder that seriously affects the ability to perform daily and routine activities, resulting in major socio-economic losses (1). Alzheimer's disease (AD), a progressive neurodegenerative disease ultimately leading to death, is the main cause of dementia in the elderly, with a prevalence of more than 45 million cases worldwide (2). With the significant increase in life expectancy, and consequently, more elderly people in the world population, this pathology is now an important public health problem (3).

AD is divided into two major forms: familial Alzheimer's disease (FAD), with an autosomal dominant inheritance pattern, and sporadic AD, or Late Onset Alzheimer's Disease (LOAD). Familial forms of inheritance account for approximately 5% of all diagnosed cases (4). The sporadic form generally affects individuals after 65 years of age and accounts for more than 90% of patients with AD. In these cases, the disease has a multifactorial etiology, being triggered by the accumulation of genetic and environmental events (5). Single nucleotide polymorphisms (SNPs) are commonly used in AD studies in an attempt to identify a genotype that presents a global association with the disease. The best-studied gene in relation to AD, which exhibits the strongest association with LOAD, is the *Apolipoprotein E* gene (*APOE*) (6). The *APOE*  $\epsilon$ 4 isoform is the major risk factor for LOAD, as the number of copies of this allele interferes with the predisposition and lifespan of carriers of more than one copy (7). The protein encoded by this gene is the major apolipoprotein of chylomicron. It binds to a specific liver and peripheral cell receptor and is essential for the normal catabolism of triglyceride-rich lipoprotein constituents. Abnormal regulation of cholesterol and triglyceride metabolism is frequently involved in the pathogenesis of AD (8)(9).

Another gene showing an association with AD is *MTHFD1L*, which encodes an enzyme that functions in the folate pathway and, consequently, in the determination of homocysteine levels. Folate deficiency and elevated homocysteine levels are related to both depression and inflexible cognition (10).

*Serpina3* (*Serpin peptidase inhibitor clade A member 3*), previously known as *alpha-1-antichymotrypsin* (ACT), plays an important role in AD, taking part in events including coagulation, anti-inflammatory effects on macrophages and wound healing (11). This enzyme, together with A $\beta$ , has been described as one of the major components of the senile plaques, which are a hallmark of AD (12).

The *FOXO3* gene has been implicated in a number of neurodegenerative diseases, including AD(13). *FOXO3* is involved in apoptosis, stress responses, cell cycle arrest, glucose metabolism, and aging (14) (15).

Therefore, the main objective of this study was to validate the association of SNPs in the *APOE* (rs429358 and rs7412), *MTHFD1L* (rs11754661), *SERPINA3* (rs4934) and *FOXO3* (rs2802292) genes with LOAD through an association study in subjects from southeastern Brazil.

## 2. Results

All the polymorphisms were in H-WE equilibrium in both the controls and AD patients. The characteristics of each sample group, such ethnic background, sex, age composition, *APOE* status, and level of education, are shown in Table 1. No differences between the samples were observed in relation to sex, ethnic background or age. However, education level appeared to affect the predisposition for the disease. As expected, the *APOE*  $\epsilon 4$  allele frequency was significantly increased in AD patients.

The genotypic frequencies of the SNPs are shown in Table 2. *APOE* rs429358 and rs7412, *MTHFD1L* rs11754661, and *SERPINA3* rs4934 showed significant associations with AD. While the *APOE*  $\epsilon 3\epsilon 3$  genotype was indicated to be a protective factor for AD (OR: 0.438; CI: 0.274-0.702;  $p = 0.001$ ), *APOE*  $\epsilon 4\epsilon 4$  was responsible for an 8.737-fold increase in the risk of developing AD (CI: 2.825-27.022;  $p = 0.000$ ). Other variants that were indicated to be risk factors were the *MTHFD1L* GG and *SERPINA3* AG genotypes, which increased the risk of the disease by 3.305-fold (CI: 1.348-8.105;  $p = 0.008$ ) and 1.744-fold (1.099-2.769;  $p = 0.018$ ), respectively. Interestingly, the *SERPINA3* GG genotype was indicated to be a protective factor against AD (OR: 0.600; CI: 0.370-0.973;  $p = 0.038$ ). The difference in the frequency of *FOXO3* rs2802292 between patients and controls was not statistically significant.

The results of logistic regression analysis are shown in Table 3. No association was observed between the variants in the *MTHFD1L*, *SERPINA3* and *FOXO3* genes and the variables age, sex, education level, ethnic background, and *APOE*  $\epsilon 4$  status. However, these environmental variables did show a significant association with the  $\epsilon 3\epsilon 3$  and  $\epsilon 4\epsilon 4$  genotypes of *APOE* (OR: 0.450; CI: 0.251-0.806;  $p = 0.007$  and OR: 5.197; CI: 1.551-17.415;  $p = 0.008$ , respectively).

### 3. Discussion

Despite several studies on the pathology of AD, the understanding of its etiology is still incomplete. The present study allowed the identification of positive associations of *MTHDIL* (rs11754661), *SERPINA3* (rs4934) and *APOE* (rs429358 and rs7412) polymorphisms with AD. Our results suggest that the etiology of AD may involve the folate pathway and support the participation of proteins that form amyloid plaques in the pathology of AD. Although several functional studies have shown participation of the *FOXO3* gene in the etiology of AD, in the present study the *FOXO3* polymorphism (rs2802292) did not exhibit an association with AD in the sample group.

The main genetic marker that increases the risk of sporadic AD is the *APOE* variant (9). This gene encodes a protein involved in lipid and glucose metabolism, brain lipid transport, neuronal signaling, neuroinflammation, and mitochondrial function (16). The *APOE*  $\epsilon 4$  allele encodes an isoform that makes the structure of protein more compact, with instable and unprotected regions (17). These interactions may favor receptors for hypercholesterolemia and hyperlipidemia, resulting in the development of the disease (18). Moreover, individuals homozygous for the  $\epsilon 4$  allele exhibit a greater risk of developing LOAD than those who carry only one or no copies of this allele (19). Our results showed that *APOE*  $\epsilon 4\epsilon 4$  carriers present an increased risk of developing AD, as reported worldwide, including in populations from North America, Europe and Asia (8); (20); (21).

With regard to the  $\epsilon 3\epsilon 3$  genotype, our research findings indicated that this SNP acts as a protective factor in the sampled group, as shown by the results reported previously in an Italian population (22). The  $\epsilon 3$  allele may act similarly to an antioxidant agent (23), protecting against AD (24). However, there is no consensus regarding the effective role of the *APOE*  $\epsilon 3$  allele in the pathology of AD in distinct populations (24); (25).

The second most frequent component of beta-amyloid plaques in the brain, which are a hallmark of AD, is the Serpina3 protein encoded by the *SERPINA3* gene located at 14q32.13. Serpina3 is an anti-inflammatory protein belonging to the serine protease inhibitors, found in various parts of the human body. In the brain, the Serpina3 protein is produced by activated astrocytes<sup>13</sup>; (26) and plays a protective role against the accumulation of toxic beta-amyloid plaques<sup>46</sup>. Some studies have indicated the *SERPINA3* rs4934 polymorphism to be associated with the risk of AD in populations from Spain (27) and Italy (28), although other studies have failed to verify this finding (29); (30). In the present study, the *SERPINA3* GG genotype was indicated to act as a

protective factor against the development of AD. On the other hand, the *SERPINA3* AG polymorphism was associated with an increased risk of AD in the studied sample. However, we did not find a positive association with the *SERPINA3* AA genotype. The risk associated with heterozygosity is likely due to the A allele, but this allele was rarely found in our sample, making it difficult to verify this conjecture.

High levels of homocysteine have been implicated in AD and other neuropathological mechanisms (31), suggesting that an error in the folate pathway may be involved in the development of AD. Moreover, high levels of this compound have been correlated with poor cognitive performance in the elderly and appear to enhance the formation of amyloid plaques (32);(33). One such protein is methylenetetrahydrofolate dehydrogenase NDP (+)-dependent 1- like, encoded by the *MTHFD1L* gene, located at 6q25.1. This protein plays a key role in the folate and homocysteine pathways via modulation of tetrahydrofolate synthesis (34). In the present study, we identified a positive association of the *MTHFD1L* rs11754661 polymorphism with the risk of AD. This SNP has previously been strongly associated with AD in a genome-wide association study (35) and in the Chinese Han population (36), although a lack of association was reported in a study from Spain (37). Our results support the hypothesis that the folate pathway is involved in the development of AD.

Several *in vitro* studies conducted in *post mortem* brain tissues from patients and animal models have shown involvement of *FOXO3* in neurodegeneration and the formation of beta amyloid plaques (38–40). It has been suggested that mitochondrial dysfunction, induced by A $\beta$  plaques, leads to the generation of reactive oxygen species (41), which would culminate in oxidative damage and neuronal cell death. *FOXO3*, activated by A $\beta$  plaques, participates in the proapoptotic signaling of neurons (42).

The present study was the first to investigate the association between rs2802292 of the *FOXO3* gene and AD. Although we did not obtain statistically significant results, this potential association will be an important research topic for future studies, as *FOXO3* is highly expressed in the human brain, especially in areas vulnerable to AD (43).

We believe that the differences between our results and other studies were in large part because AD shows multifactorial inheritance. Factors such diet, oxidative stress, antioxidant intake, inflammation, and aluminum exposure may contribute to the development of the disease and can be explained by the differences in the ethnic backgrounds of the various populations studied to date. Although further research is required to achieve an overall understanding of the disease, we believe that our findings

are important for the characterization of genes related to AD and will aid in the search for useful biomarkers for early diagnosis and individualized treatment.

## 4. Material and Methods

### 4.1 Subjects

For this association study, 332 unrelated individuals from the metropolitan region of Espírito Santo, in southeastern Brazil, were enrolled. The patient group comprised 109 elders diagnosed with probable AD according to the criteria of the Alzheimer disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA) and the National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke. These patients fulfilled other criteria, such as their results in the Mini-Mental State Examination (MMSE) (score of 14-4) and Clinical Dementia Rating Scale (CDR), with confirmation via imaging examination. The control group was composed of 223 healthy elders presenting a score > 28 in the MMSE. The two groups were matched for sex, age, and ethnic background. Written informed consent was provided by all the elders or their relatives before participation in the study. Information regarding age, sex, ethnic background composition, and level of education was collected. This study was approved by the Ethics Committee for Human Research of the Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória, Brazil.

### 4.2 Genotyping

Peripheral blood (10 mL) was collected in 5% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) tubes (Vacuette, Greiner Labortechnik, Germany). For genotyping, the samples were stored at 4°C prior to analyses. The concentration and purity of genomic DNA were measured using a NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Delaware, USA). SNPs in the *APOE* (rs429358: T>C, RefSeq NG\_007084.2 and rs7412: C>T, RefSeq NG\_007084.2), *MTHFD1L* (rs11754661: A>G, RefSeq NG\_029185.1), *SERPINA3* (rs4934: A>G, RefSeq NG\_012879), and *FOXO3* (rs2802292: G>T, RefSeq NM\_001455.3) genes were genotyped using real-time polymerase chain reaction (qPCR). To validate the standard genotypes identified for each SNP, Sanger sequencing was performed on an ABI PRISM 3130XL Genetic Analyzer /HITACHI (Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA). The sequencing analysis was conducted using BioEdit software v.7.2.5 for Windows (Ibis Biosciences, Carlsbad, California, USA). Genomic DNA (30 ng/μl) was employed for qPCR according to the manufacturer's

instructions (TaqMan SNP Genotyping Assay - Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA) on a 7500 Fast Real-Time PCR System. Genotypes were analyzed using SDS v.2.0.5 software.

### 4.3 Statistical analysis

The statistical analysis was performed using SPSS software v23.0 for Windows (IBM corporation, Armonk, New York, USA). To test the association between LOAD and the SNPs, Pearson's Chi-square, Fisher's exact tests and Logistic Regression were performed. Additionally, the Odds Ratio (OR), Confidence Interval (CI, 95%), and Hardy-Weinberg Equilibrium (H-WE) was calculated. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant.

### Acknowledgements

We thank the elderly patients and their families for their participation in this study as well as nurses and graduate students in the departments of Medicine, Nutrition and Biological Sciences. This study was supported by the Brazilian foundations FAPES/CNPq/M.S.Decit/SESA and MCTI/CNPq/MEC/CAPES.

### Conflict of Interest Statement

The authors confirm that there is no conflict of interest.

### References

1. Boller,F. and Forbes,M.M. (1998) History of dementia and dementia in history: an overview. *J. Neurol. Sci.*, **158**, 125–133.
2. Prince,M., Comas-Herrera,A., Knapp,M., Guerchet,M. and Karagiannidou,M. (2016) World Alzheimer report 2016: improving healthcare for people living with dementia: coverage, quality and costs now and in the future.
3. WHO,A.D.I. (2012) Dementia: A public health priority. *Geneva World Heal. Organ. Alzheimer's Dis. Int.*
4. Lanoiselée,H.-M., Nicolas,G., Wallon,D., Rovelet-Lecrux,A., Lacour,M., Rousseau,S., Richard,A.-C., Pasquier,F., Rollin-Sillaire,A. and Martinaud,O. (2017) APP, PSEN1, and PSEN2 mutations in early-onset Alzheimer disease: A genetic screening study of familial and sporadic cases. *PLoS Med.*, **14**, e1002270.

5. Evans,D.A., Funkenstein,H.H., Albert,M.S., Scherr,P.A., Cook,N.R., Chown,M.J., Hebert,L.E., Hennekens,C.H. and Taylor,J.O. (1989) Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons: higher than previously reported. *Jama*, **262**, 2551–2556.
6. Coon,K.D., Myers,A.J., Craig,D.W., Webster,J.A., Pearson,J. V, Lince,D.H., Zismann,V.L., Beach,T.G., Leung,D. and Bryden,L. (2007) A high-density whole-genome association study reveals that APOE is the major susceptibility gene for sporadic late-onset Alzheimer's disease. *J. Clin. Psychiatry*, **68**, 613.
7. Liu,C.-C., Kanekiyo,T., Xu,H. and Bu,G. (2013) Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nat. Rev. Neurol.*, **9**, 106–118.
8. Farrer,L.A., Cupples,L.A., Haines,J.L., Hyman,B., Kukull,W.A., Mayeux,R., Myers,R.H., Pericak-Vance,M.A., Risch,N. and Van Duijn,C.M. (1997) Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease: a meta-analysis. *Jama*, **278**, 1349–1356.
9. Papassotiropoulos,A., Fountoulakis,M., Dunckley,T., Stephan,D.A. and Reiman,E.M. (2006) Genetics, transcriptomics and proteomics of Alzheimer's disease. *J. Clin. Psychiatry*, **67**, 652.
10. Mattson,M.P. and Shea,T.B. (2003) Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci.*, **26**, 137–146.
11. Dou,C., Zhang,J., Sun,Y., Zhao,X., Wu,Q., Ji,C., Gu,S., Xie,Y. and Mao,Y. (2013) The association of ACT-17 A/T polymorphism with Alzheimer's disease: a meta-analysis. *Curr. Alzheimer Res.*, **10**, 63–71.
12. Abraham,C.R., Selkoe,D.J. and Potter,H. (1988) Immunochemical identification of the serine protease inhibitor  $\alpha$  1-antichymotrypsin in the brain amyloid deposits of Alzheimer's disease. *Cell*, **52**, 487–501.
13. Akhter,R., Sanphui,P. and Biswas,S.C. (2014) The essential role of p53-up-regulated modulator of apoptosis (Puma) and its regulation by FoxO3a transcription factor in  $\beta$ -amyloid-induced neuron death. *J. Biol. Chem.*, **289**, 10812–10822.
14. Barthélémy,C., Henderson,C.E. and Pettmann,B. (2004) Foxo3a induces motoneuron death through the Fas pathway in cooperation with JNK. *BMC Neurosci.*, **5**, 48.
15. Huang,H. and Tindall,D.J. (2007) Dynamic FoxO transcription factors. *J Cell Sci*, **120**, 2479–2487.



16. Van Giau,V., Bagyinszky,E., An,S.S.A. and Kim,S.Y. (2015) Role of apolipoprotein E in neurodegenerative diseases. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.*, **11**, 1723.
17. Huang,R.Y.C., Garai,K., Frieden,C. and Gross,M.L. (2011) Hydrogen/deuterium exchange and electron-transfer dissociation mass spectrometry determine the interface and dynamics of apolipoprotein E oligomerization. *Biochemistry*, **50**, 9273.
18. Mahley,R.W. and Rall Jr,S.C. (2000) Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, **1**, 507–537.
19. Blacker,D., Haines,J.L., Rodes,L., Terwedow,H., Go,R.C.P., Harrell,L.E., Perry,R.T., Bassett,S.S., Chase,G. and Meyers,D. (1997) ApoE-4 and age at onset of Alzheimer's disease the NIMH genetics initiative. *Neurology*, **48**, 139–147.
20. Ewbank,D.C. (2004) The APOE gene and differences in life expectancy in Europe. *Journals Gerontol. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **59**, B16–B20.
21. Ji,Y., Liu,M., Huo,Y.R., Liu,S., Shi,Z., Liu,S., Wisniewski,T. and Wang,J. (2013) Apolipoprotein E  $\epsilon$ 4 frequency is increased among Chinese patients with frontotemporal dementia and Alzheimer's disease. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.*, **36**, 163–170.
22. Bosco,P., Guéant-Rodríguez,R.-M., Anello,G., Spada,R.S., Romano,A., Caraci,F., Ferri,R. and Guéant,J.-L. (2005) Allele  $\epsilon$ 4 of APOE is a stronger predictor of Alzheimer risk in Sicily than in continental South Italy. *Neurosci. Lett.*, **388**, 168–172.
23. Miyata,M. and Smith,J.D. (1996) Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and  $\beta$ -amyloid peptides. *Nat. Genet.*, **14**, 55–61.
24. Rebeck,G.W., Kindy,M. and LaDu,M.J. (2002) Apolipoprotein E and Alzheimer's disease: the protective effects of ApoE2 and E3. *J. Alzheimer's Dis.*, **4**, 145–154.
25. Nielsen,H.M., Chen,K., Lee,W., Chen,Y., Bauer,R.J., Reiman,E., Caselli,R. and Bu,G. (2017) Peripheral apoE isoform levels in cognitively normal APOE  $\epsilon$ 3/ $\epsilon$ 4 individuals are associated with regional gray matter volume and cerebral glucose metabolism. *Alzheimers. Res. Ther.*, **9**, 5.
26. Styren,S.D., Kamboh,M.I. and Dekosky,S.T. (1998) Expression of differential immune factors in temporal cortex and cerebellum: The role of  $\alpha$ -1-antichymotrypsin, apolipoprotein E, and reactive glia in the progression of

- Alzheimer's disease. *J. Comp. Neurol.*, **396**, 511–520.
27. Ezquerra,M., Blesa,R., Tolosa,E., Ballesta,F. and Oliva,R. (1998)  $\alpha$ -Antichymotrypsin gene polymorphism and risk for Alzheimer's disease in the Spanish population. *Neurosci. Lett.*, **240**, 107–109.
  28. Licastro,F., Pedrini,S., Ferri,C., Casadei,V., Govoni,M., Pession,A., Sciacca,F.L., Veglia,F., Annoni,G. and Bonafè,M. (2000) Gene polymorphism affecting  $\alpha$ 1-antichymotrypsin and interleukin-1 plasma levels increases Alzheimer's disease risk. *Ann. Neurol.*, **48**, 388–391.
  29. Ki,C.-S., Na,D.L., Kim,H.J. and Kim,J.-W. (2001) Alpha-1 antichymotrypsin and alpha-2 macroglobulin gene polymorphisms are not associated with Korean late-onset Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.*, **302**, 69–72.
  30. Murphy,G.M., Sullivan,E. V, Gallagher-Thompson,D., Thompson,L.W., Van Duijn,C.M., Forno,L.S., Ellis,W.G., Jagust,W.J., Yesavage,J. and Tinklenberg,J.R. (1997) No association between the alpha 1-antichymotrypsin A allele and Alzheimer's disease. *Neurology*, **48**, 1313–1316.
  31. Shea,T.B., Lyons-Weiler,J. and Rogers,E. (2002) Homocysteine, folate deprivation and Alzheimer neuropathology. *J. Alzheimer's Dis.*, **4**, 261–267.
  32. Tagliari,B., Zamin,L.L., Salbego,C.G., Netto,C.A. and Wyse,A.T.S. (2006) Homocysteine increases neuronal damage in hippocampal slices receiving oxygen and glucose deprivation. *Metab. Brain Dis.*, **21**, 273–278.
  33. Riggs,K.M., Spiro,A., Tucker,K. and Rush,D. (1996) Relations of vitamin B-12, vitamin B-6, folate, and homocysteine to cognitive performance in the Normative Aging Study. *Am. J. Clin. Nutr.*, **63**, 306–314.
  34. Kohli,M., Naj,A., Van Baaren,J., Hulme,W., Beecham,G., Buxbaum,J., Zuchner,S., Haines,J., Gilbert,J. and Pericak-Vance,M. (2011) Comprehensive Variant Discovery in the Late-Onset Alzheimer's Disease Susceptibility Gene MTHFD1L Using Next Generation Sequencing Technology. *Alzheimer's Dement. J. Alzheimer's Assoc.*, **7**, S188.
  35. Naj,A.C., Beecham,G.W., Martin,E.R., Gallins,P.J., Powell,E.H., Konidari,I., Whitehead,P.L., Cai,G., Haroutunian,V. and Scott,W.K. (2010) Dementia revealed: novel chromosome 6 locus for late-onset Alzheimer disease provides genetic evidence for folate-pathway abnormalities. *PLoS Genet*, **6**, e1001130.
  36. Ren,R.-J., Wang,L.-L., Fang,R., Liu,L.-H., Wang,Y., Tang,H.-D., Deng,Y.-L., Xu,W., Wang,G. and Chen,S.-D. (2011) The MTHFD1L gene rs11754661 marker

- is associated with susceptibility to Alzheimer's disease in the Chinese Han population. *J. Neurol. Sci.*, **308**, 32–34.
37. Ramírez-Lorca,R., Boada,M., Antúnez,C., López-Arrieta,J., Moreno-Rey,C., Hernández,I., Marín,J., Gayán,J., González-Pérez,A. and Alegret,M. (2011) The MTHFD1L gene rs11754661 marker is not associated with Alzheimer's disease in a sample of the Spanish population. *J. Alzheimer's Dis.*, **25**, 47–50.
38. Shi,C., Viccaro,K., Lee,H. and Shah,K. (2016) Cdk5–Foxo3 axis: initially neuroprotective, eventually neurodegenerative in Alzheimer's disease models. *J Cell Sci*, **129**, 1815–1830.
39. Pino,E., Amamoto,R., Zheng,L., Cacquevel,M., Sarria,J.-C., Knott,G.W. and Schneider,B.L. (2013) FOXO3 determines the accumulation  $\alpha$ -synuclein and controls the fate of dopaminergic neurons in the substantia nigra. *Hum. Mol. Genet.*
40. Fernandez,A.M., Jimenez,S., Mecha,M., Davila,D., Guaza,C., Vitorica,J. and Torres-Aleman,I. (2012) Regulation of the phosphatase calcineurin by insulin-like growth factor I unveils a key role of astrocytes in Alzheimer's pathology. *Mol. Psychiatry*, **17**, 705–718.
41. Abramov,A.Y., Canevari,L. and Duchen,M.R. (2004)  $\beta$ -amyloid peptides induce mitochondrial dysfunction and oxidative stress in astrocytes and death of neurons through activation of NADPH oxidase. *J. Neurosci.*, **24**, 565–575.
42. Zhao,X.-C., Cao,X.-C., Liu,F., Quan,M.-F., Ren,K.-Q. and Cao,J.-G. (2013) Regulation of the FOXO3a/Bim signaling pathway by 5, 7-dihydroxy-8-nitrochrysin in MDA-MB-453 breast cancer cells. *Oncol. Lett.*, **5**, 929–934.
43. Hoekman,M.F.M., Jacobs,F.M.J., Smidt,M.P. and Burbach,J.P.H. (2006) Spatial and temporal expression of FoxO transcription factors in the developing and adult murine brain. *Gene Expr. Patterns*, **6**, 134–140.

**Table 1.** Characteristics of sample.

Variable	AD Patients 109 (100%)	Controls 223 (100%)	p value
Sex			
Woman	75	164(49,4%)	0.366
Man	34	59(17,8%)	
Ethnical background			
Caucasians	65 (59.6%)	124 (55.6%)	0.113
Afro-Brazilians	39 (35.8%)	96 (43.0%)	
No identification	5 (4.6)	3 (1.3%)	
Scholling			
Literati	53 (48.6%)	140 (62.8%)	0.012
Illiterati	37 (33.9%)	65 (29.1%)	
No identification	19 (17.4%)	18 (8.1%)	
APOE status			
ε4 -	49 (15.1%)	146 (45.1%)	0.000 <sup>a</sup>
ε4 +	58 (17.5%)	71 (21.9%)	
Age (mean and SD)	82.3 ± 7,6	81,2± 9,9	0.144

AD Patients = Alzheimer disease patients; ε4 += ε4 carriers; ε4 -= ε4 non-carriers; SD= standard deviation; <sup>a</sup> = AD patient versus control group by x<sup>2</sup> test; <sup>b</sup>= p value of AD patient versus control group by Mann-Whitney test; p value considerer ≤ 0.05.

**Table 2.** Genotype frequencies of polymorphisms of study.

Polymorphisms	AD Patients 109(100%)	Controls 223(100%)	OR (95% CI)	p value
<i>MTHFD1L</i> (rs11754661)				
GG	103 (95.4%)	187 (88.6%)	3.305 (1.348-8.105)	0.008*
GA	5 (4.6%)	23 (10.9%)	0.418 (0.154-1.132)	0.078
AA	0 (0.0%)	1 (0.5%)	0.996 (0.987-1.004)	0.484
<i>SERPINA3</i> (rs4934)				
GG	34 (31.2%)	96 (44.0%)	0.600 (0.370-0.973)	0.038*
AG	61 (56.0%)	94 (43.1%)	1.744 (1.099-2.769)	0.018*
AA	14 (12.8%)	28 (12.8%)	1.026 (0.516-2.040)	0.941
APOE (rs rs429358 and rs7412)				
ε3ε4	40 (37.4%)	61 (28.1%)	1.540 (0.945-2.509)	0.082
ε2ε2	0 (0.0%)	1 (0.5%)	0.996 (0.987-1.004)	0.482
ε2ε3	9 (8.4%)	18 (8.3%)	1.025 (0.445-2.263)	0.954
ε2ε4	3 (2.8%)	6 (2.8%)	1.024 (0.251-4.173)	0.974
ε3ε3	40 (37.4%)	127 (58.5%)	0.438 (0.274-0.702)	0.001*
ε4ε4	4 (1.8%)	15 (14.04%)	8.737 (2.825-27.022)	0.000*
<i>FOXO3</i> (rs2802292)				
TT	23 (21.1%)	62 (28.1%)	0.694 (0.403-1.198)	0.189
GT	61 (56.0%)	121 (54.8%)	1.071 (0.676-1.698)	0.770
GG	25 (22.9%)	38 (17.2%)	1.449 (0.822-2.554)	0.198

AD Patients = Alzheimer disease patients; OR = odds ratio; CI = confidential interval; p value considerer ≤ 0.05.

**Table 3.** Logistic regression analysis of polymorphisms of study.

Polymorphisms	AD Patients 109(100%)	Controls 223(100%)	OR (95% CI)	<sup>a</sup> p value	OR (95% CI)	<sup>b</sup> P value
<i>MTHFD1L</i> (rs11754661)						
GG	103 (95.4%)	187 (88.6%)	1 (Reference)	1 (Reference)	1 (Reference)	-
GA	5 (4.6%)	23 (10.9%)	0.547 (0.197-1.520)	0.247	0.545 (0.196-1.514)	0.244
AA	0 (0.0%)	1 (0.5%)	0.000 (0.000)	1	0.000 (0.000)	1
<i>SERPINA3</i> (rs4934)						
GG	34 (31.2%)	96 (44.0%)	1 (Reference)	1 (Reference)	1 (Reference)	-
AG	61 (56.0%)	94 (43.1%)	1.832 (1.104-3.042)	0.019*	1.557(0.873-2.776)	0.137
AA	14 (12.8%)	28 (12.8%)	1.412 (0.666-2.993)	0.368	1.269(0.542-2.972)	0.583
APOE (rs rs429358 and rs7412)						
ε3ε4	40 (37.4%)	61 (28.1%)	1.540 (0.945-2.509)	0.082	1 (Reference)	-
ε2ε2	0 (0.0%)	1(0.5%)	0.000 (0.000)	1	0.000 (0.000)	1
ε2ε3	9 (8.4%)	18 (8.3%)	0.762 (0.212-1.864)	0.552	0.491 (0.162-1.488)	0.209
ε2ε4	3 (2.8%)	6 (2.8%)	0.762 (0.180-3.225)	0.712	0.796 (0.134-4.738)	0.802
ε3ε3	40 (37.4%)	127 (58.5%)	0.480 (0.282-0.819)	0.007*	0.450 (0.251-0.806)	0.007*
ε4ε4	4 (1.8%)	15 (14.04%)	5.719 (1.770-18.478)	0.004*	5.197(1.551-17.415)	0.008*
<i>FOXO3</i> (rs2802292)						
TT	23 (21.1%)	62 (28.1%)	1 (Reference)	1 (Reference)	1 (Reference)	-
GT	61 (56.0%)	121 (54.8%)	1.773 (0.885-3.555)	0.106	1.347 (0.604-3.004)	0.467
GG	25 (22.9%)	38 (17.2%)	1.359 (0.769-2.400)	0.291	1.406 (0.727-2.718)	0.311

AD Patients = Alzheimer disease patients; OR = odds ratio; CI = confidential interval; p value considerer  $\leq 0.05$ ; <sup>a</sup> = crude p value; <sup>b</sup>

= p value adjusted by the variables age, gender, educational attainment, ethnical background and APOE ε4 status

## 4.2 Manuscrito 2

O manuscrito intitulado “*POSITIVE ASSOCIATION OF A SIRT1 VARIANT AND PARAMETERS OF OXIDATIVE STRESS ON ALZHEIMER’S DISEASE*” foi submetido para avaliação ao periódico *Neuroscience Letter*, de acordo com os critérios estipulados pelo Regimento do Programa de Pós-Graduação Renorbio.

Figura 17: Comprovação da submissão do Manuscrito 2

Re: POSITIVE ASSOCIATION OF A SIRT1 VARIANT AND PARAMETERS OF OXIDATIVE STRESS ON ALZHEIMER'S DISEASE  
by Daniela Camporez, M.D; Luciano Belcavello; Geralda G Silva-Sena; Lúcia Helena S Pimassoni; Renato L Morelato; Maria do Carmo p Batitucci; Flavia Paula  
Research paper

Dear Mrs. Camporez,

Your submission entitled "POSITIVE ASSOCIATION OF A SIRT1 VARIANT AND PARAMETERS OF OXIDATIVE STRESS ON ALZHEIMER'S DISEASE" has been received for consideration in Neuroscience Letters.

Action ▲	Manuscript Number ▲▼	Title ▲▼	Initial Date Submitted ▲▼	Status Date ▲▼	Current Status ▲▼
<a href="#">View Submission</a> <a href="#">Send E-mail</a>		POSITIVE ASSOCIATION OF A SIRT1 VARIANT AND PARAMETERS OF OXIDATIVE STRESS ON ALZHEIMER'S DISEASE	22 May 2018	22 May 2018	Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display  results per page.

**POSITIVE ASSOCIATION OF A *SIRT1* VARIANT AND PARAMETERS OF  
OXIDATIVE STRESS ON ALZHEIMER'S DISEASE**

Daniela Camporez<sup>1,2</sup>, Luciano Belcavello<sup>3</sup>, Geralda Gillian Silva-Sena<sup>4</sup>, Lúcia Helena Sagrillo Pimassoni<sup>5</sup>, Renato Lírio Morelato<sup>5,6</sup>, Maria do Carmo Pimentel Batitucci<sup>2,7</sup>, Flavia de Paula<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Renorbio, Universidade Federal do Espírito Santo, CEP 29043-900, Vitória, ES, Brazil.

<sup>2</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Humanas e Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo, CEP 29075-910, Vitória, ES, Brazil.

<sup>3</sup>Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, Viamão, RS, Brazil.

<sup>4</sup>Departamento de Educação Integrada em Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, CEP 29043-900, Vitória, ES, Brazil.

<sup>5</sup>Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória, CEP 29027-502, Vitória, ES, Brazil.

<sup>6</sup>Hospital da Santa Casa de Misericórdia de Vitória, CEP 29025-023, Vitória, ES, Brazil.

<sup>7</sup>Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Centro de Ciências Humanas e Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo, CEP 29075-910, Vitória, ES, Brazil.

**Corresponding Author:** Daniela Camporez

Departamento de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Humanas e Naturais,  
Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Fernando Ferrari, 514, Goiabeiras, Prédio  
Lydia Behar, sl. 102, CEP 29075-073, Vitória, ES, Brazil.

Telephone 1: (55) 27-4009-2324, ramal 5324.

Telephone 2: (55) 27-995208540

Email address: [danielacamporez@gmail.com](mailto:danielacamporez@gmail.com)



**Abstract**

Alzheimer's disease (AD) is a complex neurodegenerative disorder and the most common type of dementia in the elderly. Although its cause is not completely known, several studies suggest that oxidative stress plays an important role in the etiology of this disease. The SIRT1 and SOD2 proteins are linked to pathways that may impair oxidative stress. In this study, we analyzed the association between polymorphisms in these genes and in the *APOE* gene, through RT-PCR, as well as between environmental factors and the risk of AD. Additionally, the thiobarbituric acid reactive substance assay was performed to estimate the plasma level of malondialdehyde (MDA), a biomarker of lipid peroxidation. Furthermore, some cytogenetic studies indicate that cells of AD patients show increased chromosomal damage; thus, we performed the micronucleus cytome assay to assess cytogenetic damage in AD patients. As expected, the *APOE* polymorphisms were found to be highly associated with AD. Additionally, the CT genotype of the *SIRT1* gene showed a positive association with the disease. The frequencies of genomic damage (micronucleus, buds, nucleoplasmic bridges and binucleated cells), the presence of cell death biomarkers (condensed chromatin, karyorrhexis and pyknosis), and the plasma level of MDA were significantly greater in AD patients than in controls. Our results support the hypothesis that AD is a condition with increased oxidative stress and genomic instability, which may contribute to the neurodegeneration in AD.

**Keywords:** Oxidative stress, SIRT1, SOD2, APOE, Genomic instability, malondialdehyde.

## Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia in the elderly, affecting nearly 35 million people worldwide [1]. This devastating disease is characterized by progressive neurodegeneration with multifactorial etiology. AD dysfunctions include calcium dysregulation, proteolysis failure, altered cell signaling, mitochondrial dysfunction and oxidative stress, which lead to synaptic dysfunction, nerve cell death and neurodegeneration [2].

Oxidative stress is accepted to play a key role in the pathology of AD. This process results from an imbalance between elevated free radical production and the decrease in either free radical scavenging or the mechanisms used to repair oxidized macromolecules. The overproduction of free radicals is capable of damaging proteins, lipids, and DNA, leading to cellular instability events, such chromosomal damage and cell death [3–6]. These events can be easily measured by the micronucleus assay, considered a reliable biomarker of genetic instability in numerous applications [7–10].

Genes involved in cellular mechanisms of oxidative damage repair are strong candidates for AD [11]. These genes include *SIRT1* (*Silent Information Regulator Type 1*), located on chromosome 10q21.3, and *SOD2* (*Superoxide dismutase 2*), on chromosome 6q25.3. Since the SIRT1 protein can increase life span through the regulation of cellular metabolism, it is a possible protective factor for AD [12]. The gene *SOD2* encodes a protein involved in the repair of oxidative damage and is located in a region that shows evidence of a relationship with AD in genome wide association studies (GWAS) [13]. Despite the large number of genes supposedly related to AD, to date, the  $\epsilon 4$  allele of the *APOE* gene on 19q13.2 is considered the major risk factor for the disease in several populations [14]. The study of genetic variants associated with the risk for AD is useful to understand the mechanisms of the disease, aiding in complementary diagnosis.

Additionally, lipid peroxidation is one of the most important manifestations of oxidative stress and results in the production of toxic aldehydes, such malondialdehyde (MDA), a mutagenic compound measured by the chemical determination of thiobarbituric acid reactive substances – TBARs [15–17].

The search for biomarkers of genomic instability is fundamental to improving the implementation of diagnosis and treatment. In this context, the main objectives of this study were to validate the association of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the

*SIRT1* and *SOD2* genes with late-onset Alzheimer's disease and to estimate the level of cellular and genomic damage and lipid peroxidation in AD patients.

## Materials and Methods

### Subjects

All cases fulfilled the clinical criteria for probable AD [18] and had a complete diagnostic evaluation for dementia, including CT scan, standard laboratory tests (complete blood count, serum electrolytes, serum glucose, blood urea nitrogen, vitamin B12, folate, thyroid function, and syphilis serology) performed at the time of diagnosis and repeated after 2 years, and the Clinical Dementia Rating (CDR) [19]. The control sample consisted of volunteers who did not have cognitive deficits or relatives known to have AD.

For genotyping, a total of 332 non-consanguineous subjects, comprising 109 late-onset AD patients and 223 nondemented healthy controls from a single geographical location in Vitória – ES, Southeast of Brazil, were enrolled in the study. Peripheral blood (10 ml) was collected in 5% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) tubes (Vacurette, Greiner Labortechnik, Germany).

In this study, we used the cytokinesis-block micronucleus cytome (CBMNcyt) assay in peripheral blood lymphocytes collected with heparin and the buccal micronucleus cytome (BMNcyt) assay in exfoliated buccal cells. For these two assays, cells were collected from 20 subjects. Both the AD and the control groups consisted of 7 females and 3 males (mean age:  $81.0 \pm 7.3$  and  $82.0 \pm 8.7$ , respectively,  $p = 0.909$ ), with patients presenting the disease for a mean duration of  $3.8 \pm 3.0$  years (range: 1-10 years). All patients were on cholinergic therapy at the time of enrollment in the study. During a face-to-face interview, volunteers or their caregivers were asked to answer an adapted questionnaire from the International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens [20] to minimize confounding factors, all subjects in these protocols were purposely selected to be non-smokers, non-alcohol drinkers with no recent X-ray exposure. AD patients and controls were matched for sex, age, and ethnic background.

For the TBARs study, blood samples were collected from 50 subjects by venipuncture with EDTA. Both the AD and the control groups consisted of 20 females and 5 males (mean age:  $80.0 \pm 5.5$  and  $80.5 \pm 10.7$ , respectively,  $p = 0.884$ ), with patients presenting the disease for a mean duration of  $4.3 \pm 3.0$  years (range: 1-10 years).

This study was approved by the Research Ethics Committee of Emescam (School of Health Sciences of Santa Casa of Vitória), and written informed consent was obtained from each subject or from his/her surrogate prior to his/her inclusion into the study. All experiments were conducted in accordance with the Declaration of Helsinki.

### **Genotyping**

For genotyping, the samples were stored at 4°C prior to analyses. The concentration and purity of genomic DNA were measured using a NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Delaware, USA). SNPs in the *APOE* (rs429358: T>C, RefSeq NG\_007084.2 and rs7412: C>T, RefSeq NG\_007084.2), *SIRT1* (rs2273773: C>T, RefSeq NG\_050664.1), and *SOD2* (rs4880: A>G, RefSeq NM\_000636.3) genes were genotyped using real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR).

For each SNP, three standard genotypes identified through Sanger sequencing were used in all reactions of qPCR. The sequencing analysis was conducted using BioEdit software v.7.2.5 for Windows (Ibis Biosciences, Carlsbad, California, USA) in ABI PRISM 3130XL Genetic Analyzer/HITACHI (Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA).

Genomic DNA (30 ng/μl) was employed for qPCR on a 7500 Fast Real-Time PCR System according to the manufacturer's instructions (TaqMan SNP Genotyping Assay – Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA). Genotypes were analyzed using SDS v.2.0.5 software.

### **CBMNcyt Assay**

The lymphocytes were cultured according to the methodology developed by Fenech; Morley, (1985). For each subject, 2,000 binucleated cells with well-preserved cytoplasm (1,000 cells from each of two replicate cultures) were scored for the presence of micronuclei (MN), nucleoplasmic bridges and buds, following the criteria described by Bolognesi; Fenech, (2013). Frequencies of cells carrying these abnormalities were expressed per 1,000 binucleated cells scored. The cell cycle alteration was expressed by the variations of the Nuclear Division Index (NDI), which was calculated by counting 1,000 cells per subject according to Eastmond and Tucker, 1989. The analyses were performed using an optical microscope (1,000x).

### **BMNcyt Assay**

Subjects were asked to rinse their mouths with water, and a premoistened cytobrush was used to sample cells from both sides of the interior cheek. The swab was immersed in 5 ml cold saline (0.9% w/v, aqueous NaCl) in a conical tube. The samples were centrifuged at 1,500 rpm for 10 min, and the resulting pellets were washed three times more with 2 ml of saline under the same centrifugation conditions. The cell suspension was dropped onto a slide, air dried and fixed in 80% methanol. Slides were stained with pure Leishman for 2 min followed by 15 min in 10% Leishman aqueous solution, rinsed in distilled water and air dried. We used the criteria of scoring described by Thomas and co-workers (2009). The BMNcyt assay measures biomarkers of DNA damage (MN and buds), cell death (condensed chromatin, pyknosis, karyorrhexis and karyolysis) and cytokinetic defects (binucleated cells). Two thousand cells per subject (1,000 from each duplicate slide) were scored blindly by the same person, using optical microscopy (1,000x).

### **TBAR Assay**

In this work, we adopted a modified method from Buege and Aust, (1978). Blood samples were kept in an ice bath until the time of centrifugation, which was performed at 1,500 rpm for 10 min. Plasma samples were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis. To a volume of 1 ml of plasma, 2 ml of aqueous acid solution (15% trichloroacetic acid, 0.375% TBA, 0.25 N HCl and 2.5 mM butylated hydroxytoluene-BHT), diluted in ethanol, was added. BHT, an antioxidant, was added to prevent MDA formation, which could result in falsely elevated TBA reactivity, during the assay. Samples were heated for 30 min at  $95^{\circ}\text{C}$ , cooled at room temperature and centrifuged at 3,000 rpm for 10 min. Absorbance values were read in a spectrophotometer at 532 and 572 nm. Absorbance at 572 nm was subtracted from absorbance at 532 nm. MDA values were estimated with the extinction coefficient of MDA-TBA complex at 532 nm =  $1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$  [24].

## Statistical Analysis

To test the association between AD and the SNPs, Pearson's Chi-square and Fisher's exact tests and Logistic Regression were performed. Additionally, the odds ratio (OR), confidence interval (CI, 95%), and Hardy-Weinberg Equilibrium (H-WE) were calculated. Statistical analysis was performed using SPSS software v23.0 for Windows (IBM corporation, Armonk, New York, USA). For the CBMNcyt, BMNcyt and TBARs assays, the normality of the data was checked using the D'Agostino-Pearson test. Comparisons of mean values between groups were examined by parametric (unpaired Student's t test) or non-parametric (Mann-Whitney U) tests, when applicable. Data were expressed as the mean  $\pm$  standard deviation, and  $p < 0.05$ , for a two-tailed test, was considered statistically significant.

## Results

### Genotyping

The characteristics of each sample group, such ethnic background, sex, age, *APOE* status, and level of education, are shown in Table 1.

No significant differences between the samples were observed in relation to ethnic background, sex or age. However, a low education level appeared to affect the predisposition for the disease. The genotypic frequencies of the SNPs and results of logistic regression analysis are shown in Tables 2 and 3, respectively. As expected, the *APOE*  $\epsilon 4$  allele frequency was significantly increased in AD patients. We also found a significant value for the *APOE*  $\epsilon 3$  allele. A positive association with AD was detected for a *SIRT1* variant but not for *SOD2*. All of the polymorphisms were in H-WE equilibrium in both the controls and AD patients.

### Genomic instability and oxidative stress

The results of the CBMNcyt assay in blood lymphocytes and the BMNcyt assay in epithelial buccal cells are summarized in Table 4. We detected higher frequencies of MN, nucleoplasmic bridges and buds in lymphocytes from AD patients, compared with controls. Moreover, the evaluation of epithelial buccal cells also revealed elevated frequencies of MN, buds, binucleated cells, condensed chromatin, karyorrhexis, and pyknosis in AD patients, in relation to controls.

We performed a TBAR assay to estimate the level of MDA, a biomarker of lipid peroxidation. The mean level of MDA in plasma was significantly higher in the AD patients than in the controls (Fig. 1).

## Discussion

The current study allowed the identification of positive associations of *SIRT1* (rs2273773) and *APOE* (rs429358 and rs7412) polymorphisms with AD. Significant results were also found in AD patients for chromosomal damage and a higher level of plasma malondialdehyde. Our results support the hypothesis that oxidative stress may play an important role in the etiology of AD.

Several lines of evidence suggest that oxidative damage is involved in the aging process and, particularly, in neurodegenerative diseases such as AD. The brain metabolism of AD individuals appears to be more affected by reactive oxygen species damage than that of healthy older adults [25,26]. This may partially explain the increase in oxidative damage to nucleic acids and a mitochondrial dysfunction in the brain affected by AD [27–29].

Our results show that individuals carrying the CT genotype of the *SIRT1* rs2273773 variant have a greater probability of developing AD than those who carry the TT genotype, suggesting that the TT genotype is a protective factor for AD. We did not find a positive result for the CC genotype, probably because of the sample size. SIRT1 is one of the sirtuins involved in the control of apoptosis, cell survival, the modulation of reactive oxygen species (ROS) levels, and mitochondrial biogenesis and function [30]. It constitutes a molecular link between aging and human degenerative disorders [31]. The *SIRT1* rs2273773 polymorphism has been analyzed in several studies for a role in neuroprotection against the formation of ROS in AD and other neurotoxic conditions [32,33]. As *SIRT1* can regulate the aging and metabolic processes involved in the pathogenesis of AD, it may represent a potential therapeutic target. Our results support the hypothesis that the *SIRT1* rs2273773 polymorphism is associated with AD and reinforces the supposition that oxidative stress can be involved in its pathogenesis.

Some genetic variants increase the risk of developing AD, particularly the  $\epsilon 4$  allele of the *Apolipoprotein E* (ApoE) gene, whose product is involved in the transport of cholesterol

[34]. In our work, an individual who carries two copies of this allele is 8 times more likely to develop AD and has an earlier onset of symptoms than an individual who develops the disease but carries only one or no copies of the *ApoE-ε4* allele. Carrying the *APOE-ε4* allele is an established risk factor for sporadic AD [14,35]. Our results showed that *APOE-ε4ε4* carriers present an increased risk of developing AD, as reported worldwide, including in populations from North America, Europe and Asia [14,36,37]. Regarding the *APOE-ε3ε3* genotype, our findings indicated that this SNP acts as a protective factor, which is in accordance with previous reports in an Italian population [38]. The  $\epsilon 3$  allele may act similarly to an antioxidant agent [39], protecting against AD [40]. However, there is no consensus regarding the effective role of the *APOE-ε3* allele in the pathology of AD in different populations [40,41].

SODs are crucial to the endogenous signaling system that protects cells and tissues from oxidative stress [42]. Although functional studies have shown a role for SOD2 in the disease, in the present study, the *SOD2* polymorphism (rs4880) did not exhibit an association with AD.

Early studies employing the CBMNcyt assay to assess chromosomal damage in cells of AD patients reported a higher frequency of MN in peripheral lymphocytes of these patients than in those of controls [43,44]. In our experiments, we additionally reported the frequencies of nucleoplasmic bridges and buds in the lymphocytes of AD patients. The inclusion of these markers of chromosomal damage allows the assessment of complementary events of genomic instability. The BMNcyt assay in MN-exfoliated buccal cells is a potential biomarker of genome instability. This assay has been used to measure increased risk for accelerated aging, cancer, and neurodegenerative diseases [45]. In our study, we adopted the cytome approach to score not only MN but also other biomarkers of nuclear abnormalities (buds), cytokinetic defects (binucleated cells) and cell death (condensed chromatin, karyorrhectic, karyolytic and pyknotic cells).

Using the buccal micronucleus cytome assay, Thomas and Fenech (2007) detected a slight increase in MN frequency in their AD cohort, but this increase failed to reach significance. They also reported significantly lower frequencies of condensed chromatin cells and karyorrhectic cells in AD patients than in controls. Their results are in the opposite direction of the results obtained in our study; we found significantly increased frequencies of these markers in AD patients compared to controls. Additionally, we



detected significantly enhanced frequencies of buds, binucleated cells, and pyknosis in AD patients. Such different results may be partially explained by the features of the cohorts: our AD cohort comprised patients who had been diagnosed with the disease for a mean period of  $3.8 \pm 3.0$  years and were undergoing treatment with cholinesterase inhibitors at the time of enrollment in the study. In contrast, the study by Thomas; Fenech, (2007) comprised patients newly diagnosed with AD prior to the commencement of any treatment. Nevertheless, these changes indicate that the buccal cells of AD patients show significant alterations in cellular kinetics and may be useful as predictive biomarkers in identifying individuals with elevated risk for developing or having AD.

We used the TBAR assay to estimate the level of MDA, the most abundant aldehyde resulting from lipid peroxidation [17]. Measurement of MDA by TBAR assay is the most widely used method to estimate the overall lipid peroxidation level [47]. Similar to previous studies [48,49], we detected a significantly higher plasma level of MDA in AD patients than in controls, supporting the hypothesis that oxidative stress may be related to the etiology of AD. Since MDA is a toxic and mutagenic product and can damage genomic material and the membranes of cells [15,16], we suggest that the higher frequencies of DNA damage observed in the CBMNcyt and BMNcyt in AD patients may be a consequence of elevated oxidative damage.

In conclusion, our results show that *SIRT1* and *APOE* variants are associated with AD, a condition with increased oxidative stress and genomic instability characterized by elevated lipoperoxidation and genomic and cell damage. We believe that the differences between our results and those of other studies were in large part because AD shows multifactorial inheritance. Factors such diet, oxidative stress, antioxidant intake and inflammation may contribute to the development of the disease and can be explained by differences in the ethnic backgrounds of the various populations studied to date. Although further research is required to achieve an overall understanding of the disease, we believe that our findings are important for the characterization of genes and other factors related to AD and will aid in the search for useful biomarkers for early diagnosis and individualized treatment.

**Acknowledgments** This study was supported by Fundo de Apoio à Ciência e Tecnologia do Município de Vitória (grant number 5928/2011, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Espírito Santo, and MCTI/CNPq/MEC/CAPES (Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/Ministério da Educação/Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, grant number 552672/2011–4).

**Conflict of Interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- [1] M. Prince, A. Comas-Herrera, M. Knapp, M. Guerchet, M. Karagiannidou, World Alzheimer report 2016: improving healthcare for people living with dementia: coverage, quality and costs now and in the future, (2016).
- [2] S.W. Pimplikar, R.A. Nixon, N.K. Robakis, J. Shen, L.-H. Tsai, Amyloid-independent mechanisms in Alzheimer's disease pathogenesis, *J. Neurosci.* 30 (2010) 14946–14954.
- [3] S.S. Hardas, R. Sultana, A.M. Clark, T.L. Beckett, L.I. Szwedda, M.P. Murphy, D.A. Butterfield, Oxidative modification of lipoic acid by HNE in Alzheimer disease brain, *Redox Biol.* 1 (2013) 80–85.
- [4] K. Jomova, D. Vondrakova, M. Lawson, M. Valko, Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders, *Mol. Cell. Biochem.* 345 (2010) 91–104.
- [5] M.A. Lovell, W.D. Ehmann, S.M. Butler, W.R. Markesbery, Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease, *Neurology.* 45 (1995) 1594–1601.
- [6] M.A. Lovell, W.R. Markesbery, Oxidative damage in mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease, *J. Neurosci. Res.* 85 (2007) 3036–3040.
- [7] D. Benedetti, E. Nunes, M. Sarmento, C. Porto, C.E.I. dos Santos, J.F. Dias, J. da Silva, Genetic damage in soybean workers exposed to pesticides: evaluation with the comet and buccal micronucleus cytome assays, *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 752 (2013) 28–33.

- [8] A. Celik, S.B. Diler, D. Eke, Assessment of genetic damage in buccal epithelium cells of painters: micronucleus, nuclear changes, and repair index, *DNA Cell Biol.* 29 (2010) 277–284.
- [9] N. Holland, C. Bolognesi, M. Kirsch-Volders, S. Bonassi, E. Zeiger, S. Knasmueller, M. Fenech, The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps, *Mutat. Res. Mutat. Res.* 659 (2008) 93–108.
- [10] L. Migliore, F. Coppedè, M. Fenech, P. Thomas, Association of micronucleus frequency with neurodegenerative diseases, *Mutagenesis.* 26 (2011) 85–92.
- [11] G.G. Ortiz, F.P.P. Moisés, M. Mireles-Ramírez, L.J. Flores-Alvarado, H. González-Usigli, V.J. Sánchez-González, A.L. Sánchez-López, L. Sánchez-Romero, E.I. Díaz-Barba, J.F. Santoscoy-Gutiérrez, Chapter One-Oxidative Stress: Love and Hate History in Central Nervous System, *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* 108 (2017) 1–31.
- [12] H.J. Lee, S.J. Yang, Aging-related correlation between serum sirtuin 1 activities and basal metabolic rate in women, but not in men, *Clin. Nutr. Res.* 6 (2017) 18–26.
- [13] H.W. Wiener, R.T. Perry, Z. Chen, L.E. Harrell, R.C.P. Go, A polymorphism in SOD2 is associated with development of Alzheimer's disease, *Genes, Brain Behav.* 6 (2007) 770–776.
- [14] L.A. Farrer, L.A. Cupples, J.L. Haines, B. Hyman, W.A. Kukull, R. Mayeux, R.H. Myers, M.A. Pericak-Vance, N. Risch, C.M. Van Duijn, Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease: a meta-analysis, *Jama.* 278 (1997) 1349–1356.
- [15] L.J. Marnett, Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde, *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 424 (1999) 83–95.
- [16] S. Pizzimenti, E.S. Ciamporcero, M. Daga, P. Pettazzoni, A. Arcaro, G. Cetrangolo, R. Minelli, C. Dianzani, A. Lepore, F. Gentile, Interaction of aldehydes derived from lipid peroxidation and membrane proteins, *Front. Physiol.* 4 (2013) 242.
- [17] K. Uchida, Redox-derived damage-associated molecular patterns: ligand function

- of lipid peroxidation adducts, *Redox Biol.* 1 (2013) 94–96.
- [18] G.M. McKhann, D.S. Knopman, H. Chertkow, B.T. Hyman, C.R. Jack, C.H. Kawas, W.E. Klunk, W.J. Koroshetz, J.J. Manly, R. Mayeux, The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease, *Alzheimer's Dement. J. Alzheimer's Assoc.* 7 (2011) 263–269.
- [19] J.C. Morris, The Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules., *Neurology.* (1993).
- [20] A. V Carrano, A.T. Natarajan, Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques, *Mutat. Res. Toxicol.* 204 (1988) 379–406.
- [21] M. Fenech, A. Morley, Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay, *Cytobios.* 43 (1985) 233–246.
- [22] C. Bolognesi, M. Fenech, Micronucleus assay in human cells: lymphocytes and buccal cells, in: *Genotoxicity Assess.*, Springer, 2013: pp. 191–207.
- [23] J.A. Buege, S.D. Aust, Microsomal lipid peroxidation *Methods Enzymol* 52: 302–310, Find This Artic. Online. (1978).
- [24] A. Valenzuela, The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress, *Life Sci.* 48 (1991) 301–309.
- [25] W.R. Markesbery, The role of oxidative stress in Alzheimer disease, *Arch. Neurol.* 56 (1999) 1449–1452.
- [26] Y. Christen, Oxidative stress and Alzheimer disease, *Am. J. Clin. Nutr.* 71 (2000) 621s–629s.
- [27] P.E. Coskun, M.F. Beal, D.C. Wallace, Alzheimer's brains harbor somatic mtDNA control-region mutations that suppress mitochondrial transcription and replication, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 10726–10731.
- [28] P. Mecocci, U. MacGarvey, M.F. Beal, Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease, *Ann. Neurol.* 36 (1994) 747–751.
- [29] L. Pei, D.C. Wallace, Mitochondrial Etiology of Neuropsychiatric Disorders, *Biol. Psychiatry.* (2017).

- [30] N. Treviño-Saldaña, G. García-Rivas, Regulation of Sirtuin-Mediated Protein Deacetylation by Cardioprotective Phytochemicals, *Oxifile*///C/Users/Daniela C/Desktop/Qualificação/Referencias/Scholar Sirt 413.Risdativ Med. Cell. Longev. 2017 (2017).
- [31] P.T. Pfluger, D. Herranz, S. Velasco-Miguel, M. Serrano, M.H. Tschöp, Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105 (2008) 9793–9798.
- [32] G.M. Pasinetti, Z. Zhao, W. Qin, L. Ho, Y. Shrishailam, D. MacGrogan, W. Ressmann, N. Humala, X. Liu, C. Romero, Caloric intake and Alzheimer's disease, in: *Mech. Diet. Restrict. Aging Dis.*, Karger Publishers, 2007: pp. 159–175.
- [33] C. Julien, C. Tremblay, V. Émond, M. Lebbadi, N. Salem, D.A. Bennett, F. Calon, Sirtuin 1 reduction parallels the accumulation of tau in Alzheimer disease, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 68 (2009) 48–58.
- [34] K.D. Coon, A.J. Myers, D.W. Craig, J.A. Webster, J. V Pearson, D.H. Lince, V.L. Zismann, T.G. Beach, D. Leung, L. Bryden, A high-density whole-genome association study reveals that APOE is the major susceptibility gene for sporadic late-onset Alzheimer's disease, *J. Clin. Psychiatry.* 68 (2007) 613.
- [35] E.H. Corder, A.M. Saunders, W.J. Strittmatter, D.E. Schmechel, P.C. Gaskell, Gw. al Small, A.D. Roses, J.L. Haines, M.A. Pericak-Vance, Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families, *Science* (80-. ). 261 (1993) 921–923.
- [36] D.C. Ewbank, The APOE gene and differences in life expectancy in Europe, *Journals Gerontol. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* 59 (2004) B16–B20.
- [37] Y. Ji, M. Liu, Y.R. Huo, S. Liu, Z. Shi, S. Liu, T. Wisniewski, J. Wang, Apolipoprotein E  $\epsilon$ 4 frequency is increased among Chinese patients with frontotemporal dementia and Alzheimer's disease, *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 36 (2013) 163–170.
- [38] P. Bosco, R.-M. Guéant-Rodríguez, G. Anello, R.S. Spada, A. Romano, F. Caraci, R. Ferri, J.-L. Guéant, Allele  $\epsilon$ 4 of APOE is a stronger predictor of Alzheimer risk in Sicily than in continental South Italy, *Neurosci. Lett.* 388

- (2005) 168–172.
- [39] M. Miyata, J.D. Smith, Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and  $\beta$ -amyloid peptides, *Nat. Genet.* 14 (1996) 55–61.
- [40] G.W. Rebeck, M. Kindy, M.J. LaDu, Apolipoprotein E and Alzheimer's disease: the protective effects of ApoE2 and E3, *J. Alzheimer's Dis.* 4 (2002) 145–154.
- [41] H.M. Nielsen, K. Chen, W. Lee, Y. Chen, R.J. Bauer, E. Reiman, R. Caselli, G. Bu, Peripheral apoE isoform levels in cognitively normal APOE  $\epsilon$ 3/ $\epsilon$ 4 individuals are associated with regional gray matter volume and cerebral glucose metabolism, *Alzheimers. Res. Ther.* 9 (2017) 5.
- [42] E. Nozik-Grayck, H.B. Suliman, C.A. Piantadosi, Extracellular superoxide dismutase, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37 (2005) 2466–2471.
- [43] L. Migliore, A. Testa, R. Scarpato, N. Pavese, L. Petrozzi, U. Bonuccelli, Spontaneous and induced aneuploidy in peripheral blood lymphocytes of patients with Alzheimer's disease, *Hum. Genet.* 101 (1997) 299–305.
- [44] L. Petrozzi, C. Lucetti, R. Scarpato, G. Gambaccini, F. Trippi, S. Bernardini, P. Del Dotto, L. Migliore, U. Bonuccelli, Cytogenetic alterations in lymphocytes of Alzheimer's disease and Parkinson's disease patients, *Neurol. Sci.* 23 (2002) s97–s98.
- [45] M. Fenech, N. Holland, E. Zeiger, W.P. Chang, S. Burgaz, P. Thomas, C. Bolognesi, S. Knasmueller, M. Kirsch-Volders, S. Bonassi, The HUMN and HUMNxL international collaboration projects on human micronucleus assays in lymphocytes and buccal cells—past, present and future, *Mutagenesis.* 26 (2011) 239–245.
- [46] P. Thomas, M. Fenech, A review of genome mutation and Alzheimer's disease, *Mutagenesis.* 22 (2007) 15–33.
- [47] F. Nielsen, B.B. Mikkelsen, J.B. Nielsen, H.R. Andersen, P. Grandjean, Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors, *Clin. Chem.* 43 (1997) 1209–1214.
- [48] I. Bourdel-Marchasson, M. Delmas-Beauvieux, E. Peuchant, S. Richard-Harston, A. Decamps, B. Reignier, J. Emeriau, M. Rainfray, Antioxidant defences and

- oxidative stress markers in erythrocytes and plasma from normally nourished elderly Alzheimer patients, *Age Ageing*. 30 (2001) 235–241.
- [49] L.L. Torres, N.B. Quaglio, G.T. de Souza, R.T. Garcia, L.M.M. Dati, W.L. Moreira, A.P. de Melo Loureiro, J. Smid, C.S. Porto, C.M. de Campos Bottino, Peripheral oxidative stress biomarkers in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease, *J. Alzheimer's Dis.* 26 (2011) 59–68.

**Table 1.** Characteristics of sample.

Variable	AD Patients N=109 (100%)	Controls N=223 (100%)	p value
Sex			
Women	75	164 (49.4%)	0.366
Men	34	59 (17.8%)	
Ethnic background			
Caucasians	65 (59.6%)	124 (55.6%)	0.113
Afro-Brazilians	39 (35.8%)	96 (43.0%)	
No identification	5 (4.6)	3 (1.3%)	
Schooling			
Literate	53 (48.6%)	140 (62.8%)	0.012*
Illiterate	37 (33.9%)	65 (29.1%)	
No identification	19 (17.4%)	18 (8.1%)	
APOE status			
ε4 -	49 (15.1%)	146 (45.1%)	0.000 <sup>a</sup>
ε4 +	58 (17.5%)	71 (21.9%)	
Age (mean and SD)	82.3 ± 7.6	81.2 ± 9.9	0.144

AD Patients = Alzheimer's disease patients; ε4 + = ε4 carriers; ε4 - = ε4 non-carriers; SD = standard deviation; <sup>a</sup> = AD patient versus control group by  $\chi^2$  test; <sup>b</sup> = p value of AD patient versus control group by Mann-Whitney test; p value  $\leq 0.05$  considered significant.

**Table 2.** Genotype frequencies of polymorphisms in study.

Polymorphisms	AD Patients N=109 (100%)	Controls N=223 (100%)	OR (95% CI)	p value
<i>SIRT1</i> (rs2273773)				
TT	78 (71.6%)	194 (88.2%)	0.376 (0.213-0.665)	0.001*
CT	29 (26.6%)	22 (10.0%)	3.312 (1.796-6.106)	0.000*
CC	2 (1.8%)	4 (1.8%)	1.023 (0.185-5.675)	0.641
<i>SOD2</i> (rs4880)				
CC	29 (26.6%)	58 (26.9%)	0.537 (0.587-1.662)	0.988
CT	54 (49.5%)	107 (49.5%)	1.000 (0.631-1.585)	0.546
TT	26 (23.9%)	51 (23.6%)	1.013 (0.590-1.741)	0.533
APOE (rs429358 and rs7412)				
ε3ε4	40 (37.4%)	61 (28.1%)	1.540 (0.945-2.509)	0.082
ε2ε2	0 (0.0%)	1 (0.5%)	0.996 (0.987-1.004)	0.482
ε2ε3	9 (8.4%)	18 (8.3%)	1.025 (0.445-2.263)	0.954
ε2ε4	3 (2.8%)	6 (2.8%)	1.024 (0.251-4.173)	0.974
ε3ε3	40 (37.4%)	127 (58.5%)	0.438 (0.274-0.702)	0.001*
ε4ε4	4 (1.8%)	15 (14.04%)	8.737 (2.825-27.022)	0.000*

AD Patients = Alzheimer's disease patients; OR = odds ratio; CI = confidence interval; p value  $\leq 0.05$  considered significant.



**Table 3.** Logistic regression analysis of polymorphisms in study.

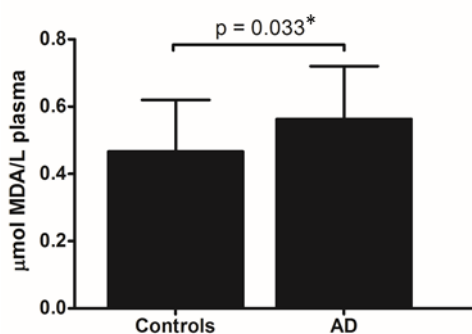
Polymorphism	AD Patients 109 (100%)	Controls 223 (100%)	OR (95% CI)	<sup>a</sup> p value	OR (95% CI)	<sup>b</sup> P value
<i>SIRT1</i> (rs2273773)						
TT	78 (71.6%)	194 (88.2%)	1 (Reference)	1 (Reference)	1 (Reference)	-
CT	29 (26.6%)	22 (10.0%)	3.279 (1.776-6.054)	0.000	4.067 (2.099-7.872)	0.000*
CC	2 (1.8%)	4 (1.8%)	1.244 (0.223-6.928)	0.804	1.253 (0.204-7.693)	0.808
<i>SOD2</i> (rs4880)						
CC	29 (26.6%)	58 (26.9%)	1 (Reference)	1 (Reference)	1 (Reference)	-
CT	54 (49.5%)	107 (49.5%)	1.009 (0.581-1.755)	0.974	0.938(0.522-1.688)	0.832
TT	26 (23.9%)	51 (23.6%)	1.020 (0.533-1.952)	0.953	0.872(0.434-1.748)	0.669
APOE (rs429358 and rs7412)						
ε3ε4	40 (37.4%)	61 (28.1%)	1.540 (0.945-2.509)	0.082	1 (Reference)	-
ε2ε2	0 (0.0%)	1(0.5%)	0.000 (0.000)	1	0.000 (0.000)	1
ε2ε3	9 (8.4%)	18 (8.3%)	0.762 (0.212-1.864)	0.552	0.491 (0.162-1.488)	0.209
ε2ε4	3 (2.8%)	6 (2.8%)	0.762 (0.180-3.225)	0.712	0.796 (0.134-4.738)	0.802
ε3ε3	40 (37.4%)	127 (58.5%)	0.480 (0.282-0.819)	0.007*	0.450 (0.251-0.806)	0.007*
ε4ε4	4 (1.8%)	15 (14.04%)	5.719 (1.770-18.478)	0.004*	5.197(1.551-17.415)	0.008*

AD Patients = Alzheimer's disease patients; OR = odds ratio; CI = confidence interval; p value ≤ 0.05 considered significant; <sup>a</sup> = crude p value; <sup>b</sup> = p value adjusted by age, gender, educational attainment, ethnic background and APOE ε4 status

**Table 4.** The CBMNcyt assay in peripheral blood lymphocytes and the BMNcyt assay from AD patients and healthy controls.

Parameter	Control ( <i>n</i> = 10)	AD patients ( <i>n</i> = 10)	<i>p</i> value
	Mean ± standard deviation	Mean ± standard deviation	
<b>CBMNcyt assay</b>			
MN	7.7 ± 2.7	11.5 ± 3.3	0.015 <sup>a</sup>
Nucleoplasmic bridges	0.6 ± 0.2	1.4 ± 0.6	0.002 <sup>a</sup>
Nuclear buds	1.9 ± 1.0	4.0 ± 1.9	0.009 <sup>a</sup>
NDI	2.0 ± 0.2	1.9 ± 0.9	0.150
<b>BMNcyt assay</b>			
MN	3.1 ± 1.6	5.0 ± 1.6	0.016 <sup>b</sup>
Nuclear buds	0.7 ± 0.6	2.6 ± 1.4	0.001 <sup>b</sup>
Binucleated cells	12.0 ± 3.5	27.4 ± 15.4	0.006 <sup>b</sup>
Condensed chromatin	33.6 ± 21.7	66.4 ± 25.4	0.006 <sup>b</sup>
Karyorrhexis	16.9 ± 15.4	32.5 ± 17.9	0.040 <sup>b</sup>
Karyolysis	283.7 ± 141.7	168.0 ± 129.8	0.073
Pyknosis	2.6 ± 1.2	4.2 ± 1.4	0.018 <sup>b</sup>

MN = micronucleus, NDI = nuclear index division in 1000 cells per subject, *n* = number of subjects. <sup>a</sup>Two thousand binucleated cells (one thousand from each of the duplicate cultures) were scored per subject in the CBMNcyt assay. <sup>b</sup>Two thousand epithelial buccal cells (one thousand from each of the duplicate slides) were scored per subject in the BMNcyt assay.



**Fig. 1** Comparison of MDA levels in plasma of AD patients (*n* = 25) and healthy controls (*n* = 25)

## 5. REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, C. R.; SELKOE, D. J.; POTTER, H. Immunochemical identification of the serine protease inhibitor  $\alpha$  1-antichymotrypsin in the brain amyloid deposits of Alzheimer's disease. **Cell**, v. 52, n. 4, p. 487–501, 1988.
- ABRAMOV, A. Y.; CANEVARI, L.; DUCHEN, M. R.  $\beta$ -amyloid peptides induce mitochondrial dysfunction and oxidative stress in astrocytes and death of neurons through activation of NADPH oxidase. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 2, p. 565–575, 2004.
- AKBARALY, T. et al. Does overall diet in midlife predict future aging phenotypes? A cohort study. **The American journal of medicine**, v. 126, n. 5, p. 411–419, 2013.
- AKHTER, R.; SANPHUI, P.; BISWAS, S. C. The essential role of p53-up-regulated modulator of apoptosis (Puma) and its regulation by FoxO3a transcription factor in  $\beta$ -amyloid-induced neuron death. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 15, p. 10812–10822, 2014.
- ALBERT, M. L.; MILDWORF, B. The concept of dementia. **Journal of Neurolinguistics**, v. 4, n. 3, p. 301–308, 1989.
- ALZHEIMER, A. Uber eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. **Allgemeine Zeitschrift Psychiatrie**, v. 64, p. 146–148, 1907.
- AMADUCCI, L. A.; ROCCA, W. A.; SCHOENBERG, B. S. Origin of the distinction between Alzheimer's disease and senile dementia How history can clarify nosology. **Neurology**, v. 36, n. 11, p. 1497, 1986.
- AN, S. S. et al. A genetic screen of the mutations in the Korean patients with early-onset Alzheimer's disease. **Clinical Interventions in Aging**, v. 11, p. 1817, 2016.
- ANEKONDA, T. S.; REDDY, P. H. Neuronal protection by sirtuins in Alzheimer's disease. **Journal of neurochemistry**, v. 96, n. 2, p. 305–313, 2006.
- ARGENTIERI, M. A. et al. Epigenetic pathways in human disease: the impact of DNA methylation on stress-related pathogenesis and current challenges in biomarker development. **EBioMedicine**, 2017.
- ARNESEN, E. et al. Serum total homocysteine and coronary heart disease. **International journal of epidemiology**, v. 24, n. 4, p. 704–709, 1995.
- BAGYINSZKY, E. et al. Role of inflammatory molecules in the Alzheimer's disease progression and diagnosis. **Journal of the Neurological Sciences**, 2017.
- BARNES, D. E.; YAFFE, K. The projected effect of risk factor reduction on

- Alzheimer's disease prevalence. **The Lancet Neurology**, v. 10, n. 9, p. 819–828, 2011.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Oxidative stress: relations between the formation of reactive species and the organism's defense. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.
- BARZILAI, N. et al. The critical role of metabolic pathways in aging. **Diabetes**, v. 61, n. 6, p. 1315–1322, 2012.
- BAZENET, C.; LOVESTONE, S. Plasma biomarkers for Alzheimer's disease: much needed but tough to find. **Biomarkers**, v. 6, n. 4, p. 441–454, 2012.
- BEAL, M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in Alzheimer's and Parkinson's diseases and coenzyme Q 10 as a potential treatment. **Journal of bioenergetics and biomembranes**, v. 36, n. 4, p. 381–386, 2004.
- BENILOVA, I.; KARRAN, E.; DE STROOPER, B. The toxic A [beta] oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. **Nature neuroscience**, v. 15, n. 3, p. 349, 2012.
- BJORKLUND, N. L.; SADAGOPARAMANUJAM, V.-M.; TAGLIALATELA, G. Selective, quantitative measurement of releasable synaptic zinc in human autopsy hippocampal brain tissue from Alzheimer's disease patients. **Journal of neuroscience methods**, v. 203, n. 1, p. 146–151, 2012.
- BLACKER, D. et al. ApoE-4 and age at onset of Alzheimer's disease the NIMH genetics initiative. **Neurology**, v. 48, n. 1, p. 139–147, 1997.
- BLESSED, G.; TOMLINSON, B. E.; ROTH, M. The association between quantitative measures of dementia and of senile change in the cerebral grey matter of elderly subjects. **The British Journal of Psychiatry**, 1968.
- BOLLER, F.; FORBES, M. M. History of dementia and dementia in history: an overview. **Journal of the neurological sciences**, v. 158, n. 2, p. 125–133, 1998.
- BOMFIM, T. R. et al. An anti-diabetes agent protects the mouse brain from defective insulin signaling caused by Alzheimer's disease-associated A $\beta$  oligomers. **The Journal of clinical investigation**, v. 122, n. 4, p. 1339–1353, 2012.
- BORDONE, L.; GUARENTE, L. Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 6, n. 4, p. 298–305, 2005.
- BREITNER, J. C. S. et al. APOE- $\epsilon$ 4 count predicts age when prevalence of AD increases, then declines The Cache County Study. **Neurology**, v. 53, n. 2, p. 321, 1999.
- BRICKELL, K. L. et al. Early-onset Alzheimer disease in families with late-onset

- Alzheimer disease: a potential important subtype of familial Alzheimer disease. **Archives of neurology**, v. 63, n. 9, p. 1307–1311, 2006.
- BRUCKI, S. M. D.; NITRINI, R. Cancellation task in very low educated people. **Archives of Clinical Neuropsychology**, v. 23, n. 2, p. 139–147, 2008.
- BRUNHOLZ, S. et al. Axonal transport of APP and the spatial regulation of APP cleavage and function in neuronal cells. **Experimental brain research**, v. 217, n. 3–4, p. 353–364, 2012.
- BUÉE, L. et al. Pathological alterations of the cerebral microvasculature in Alzheimer's disease and related dementing disorders. **Acta neuropathologica**, v. 87, n. 5, p. 469–480, 1994.
- CABEZA, R. Cognitive neuroscience of aging: contributions of functional neuroimaging. **Scandinavian journal of psychology**, v. 42, n. 3, p. 277–286, 2001.
- CAIXETA, L. Evolução do conceito de doença de Alzheimer. **Doença de Alzheimer. Porto Alegre: Artmed**, 2012.
- CAMELLI, P.; BOTTINO, C. M. C. Tratando os sintomas comportamentais e psicológicos da demência (SCPD). **J Bras Psiquiatr**, v. 56, n. 2, p. 83–87, 2007.
- CARRASQUILLO, M. M. et al. Replication of CLU, CR1, and PICALM associations with Alzheimer disease. **Archives of neurology**, v. 67, n. 8, p. 961–964, 2010.
- CARRILLO, M. C.; THIES, W.; BAIN, L. J. The global impact of Alzheimer's disease. In: **Alzheimer's Disease-Modernizing Concept, Biological Diagnosis and Therapy**. [s.l.] Karger Publishers, 2012. v. 28p. 1–14.
- CHÁVEZ-GUTIÉRREZ, L. et al. The mechanism of  $\gamma$ -secretase dysfunction in familial Alzheimer disease. **The EMBO journal**, v. 31, n. 10, p. 2261–2274, 2012.
- CHENG, J.-X. et al. Divergent topological networks in Alzheimer's disease: a diffusion kurtosis imaging analysis. **Translational neurodegeneration**, v. 7, n. 1, p. 10, 2018.
- CHRISTEN, Y. Oxidative stress and Alzheimer disease. **The American journal of clinical nutrition**, v. 71, n. 2, p. 621s–629s, 2000.
- CHRISTENSEN, K.; JOHNSON, T. E.; VAUPEL, J. W. The quest for genetic determinants of human longevity: challenges and insights. **Nature Reviews Genetics**, v. 7, n. 6, p. 436–448, 2006.
- CHUNG, H. Y. et al. Molecular inflammation: underpinnings of aging and age-related diseases. **Ageing research reviews**, v. 8, n. 1, p. 18–30, 2009.
- CLARKE, R. et al. Folate, vitamin B12, and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer disease. **Archives of neurology**, v. 55, n. 11, p. 1449–1455, 1998.

COON, K. D. et al. A high-density whole-genome association study reveals that APOE is the major susceptibility gene for sporadic late-onset Alzheimer's disease. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 68, n. 4, p. 613, 2007.

CORDER, E. H. et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. **Science**, v. 261, n. 5123, p. 921–923, 1993.

CORDER, E. H. et al. Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset. **Nature genetics**, v. 7, p. 180–184, 1994.

CORRADA, M. M. et al. Dementia incidence continues to increase with age in the oldest old: the 90+ study. **Annals of neurology**, v. 67, n. 1, p. 114–121, 2010.

COSKUN, P. E.; BEAL, M. F.; WALLACE, D. C. Alzheimer's brains harbor somatic mtDNA control-region mutations that suppress mitochondrial transcription and replication. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 29, p. 10726–10731, 2004.

CRESPO, Â. C. et al. Genetic and biochemical markers in patients with Alzheimer's disease support a concerted systemic iron homeostasis dysregulation. **Neurobiology of aging**, v. 35, n. 4, p. 777–785, 2014.

CULLEN, K. M.; KÓCSI, Z.; STONE, J. Microvascular pathology in the aging human brain: evidence that senile plaques are sites of microhaemorrhages. **Neurobiology of aging**, v. 27, n. 12, p. 1786–1796, 2006.

DAS, H. K. et al. Isolation, characterization, and mapping to chromosome 19 of the human apolipoprotein E gene. **Journal of Biological Chemistry**, v. 260, n. 10, p. 6240–6247, 1985.

DATO, S. et al. Exploring the role of genetic variability and lifestyle in oxidative stress response for healthy aging and longevity. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 8, p. 16443–16472, 2013.

DE FELICE, F. G.; LOURENCO, M. V; FERREIRA, S. T. How does brain insulin resistance develop in Alzheimer's disease? **Alzheimer's & Dementia**, v. 10, n. 1, p. S26–S32, 2014.

DE LA TORRE, J. C. Is Alzheimer's disease a neurodegenerative or a vascular disorder? Data, dogma, and dialectics. **The Lancet Neurology**, v. 3, n. 3, p. 184–190, 2004.

DE LA TORRE, J. C.; MUSSIVAN, T. Can disturbed brain microcirculation cause Alzheimer's disease? **Neurological research**, v. 15, n. 3, p. 146–153, 1993.

DE STROOPER, B.; IWATSUBO, T.; WOLFE, M. S. Presenilins and  $\gamma$ -secretase:

- structure, function, and role in Alzheimer disease. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 2, n. 1, p. a006304, 2012.
- DEJEAN, A. S.; HEDRICK, S. M.; KERDILES, Y. M. Highly specialized role of Forkhead box O transcription factors in the immune system. **Antioxidants & redox signaling**, v. 14, n. 4, p. 663–674, 2011.
- DEMETRIUS, L. A.; MAGISTRETTI, P. J.; PELLERIN, L. Alzheimer's disease: the amyloid hypothesis and the Inverse Warburg effect. **Frontiers in physiology**, v. 5, 2014.
- DEMOGRÁFICO, I. C. Resultados gerais da amostra. **Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)**, 2012.
- DEMOGRÁFICO, I. C. Resultados do universo. 2010. **Acesso em**, v. 6, 2015.
- DUCE, J. A. et al. Iron-export ferroxidase activity of  $\beta$ -amyloid precursor protein is inhibited by zinc in Alzheimer's disease. **Cell**, v. 142, n. 6, p. 857–867, 2010.
- EDITION, F.; ASSOCIATION, A. P. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders**. [s.l.] Washington, American Psychological Association, 1994.
- FALLER, P.; HUREAU, C. A bioinorganic view of Alzheimer's disease: when misplaced metal ions (re) direct the electrons to the wrong target. **Chemistry–A European Journal**, v. 18, n. 50, p. 15910–15920, 2012.
- FENG, J.; MENG, C.; XING, D.  $A\beta$  induces PUMA activation: a new mechanism for  $A\beta$ -mediated neuronal apoptosis. **Neurobiology of aging**, v. 36, n. 2, p. 789–800, 2015.
- FERNANDEZ, A. M. et al. Regulation of the phosphatase calcineurin by insulin-like growth factor I unveils a key role of astrocytes in Alzheimer's pathology. **Molecular psychiatry**, v. 17, n. 7, p. 705–718, 2012.
- FERREIRA, S. T. et al. Inflammation, defective insulin signaling, and neuronal dysfunction in Alzheimer's disease. **Alzheimer's & dementia**, v. 10, n. 1, p. S76–S83, 2014.
- FIGARSKA, S. M.; VONK, J. M.; BOEZEN, H. M. SIRT1 polymorphism, long-term survival and glucose tolerance in the general population. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e58636, 2013.
- FISCHER, V. W.; SIDDIQI, A.; YUSUFALY, Y. Altered angioarchitecture in selected areas of brains with Alzheimer's disease. **Acta neuropathologica**, v. 79, n. 6, p. 672–679, 1990.
- FLEMING, L. M. et al. Differential binding of apolipoprotein E isoforms to tau and other cytoskeletal proteins. **Experimental neurology**, v. 138, n. 2, p. 252–260, 1996.

- FLYNN, J. M.; MELOV, S. SOD2 in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 62, p. 4–12, 2013.
- FRIDMAN, C. et al. Alterações genéticas na doença de Alzheimer. **Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)**, v. 31, n. 1, p. 19–25, 2004.
- FRYE, R. A. Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 273, n. 2, p. 793–798, 2000.
- GANDY, S. The role of cerebral amyloid  $\beta$  accumulation in common forms of Alzheimer disease. **The Journal of clinical investigation**, v. 115, n. 5, p. 1121–1129, 2005.
- GATZ, M. et al. Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. **Archives of general psychiatry**, v. 63, n. 2, p. 168–174, 2006.
- GIRI, M.; ZHANG, M.; LÜ, Y. Genes associated with Alzheimer's disease: an overview and current status. **Clinical interventions in aging**, v. 11, p. 665, 2016.
- GLENNER, G. G.; WONG, C. W. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 120, n. 3, p. 885–890, 1984.
- GRADY, C. L.; CRAIK, F. I. M. Changes in memory processing with age. **Current opinion in neurobiology**, v. 10, n. 2, p. 224–231, 2000.
- GREENOUGH, M. A. et al. Presenilins promote the cellular uptake of copper and zinc and maintain copper chaperone of SOD1-dependent copper/zinc superoxide dismutase activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 11, p. 9776–9786, 2011.
- GREENOUGH, M. A.; CAMAKARIS, J.; BUSH, A. I. Metal dyshomeostasis and oxidative stress in Alzheimer's disease. **Neurochemistry international**, v. 62, n. 5, p. 540–555, 2013.
- GRUNDKE-IQBAL, I. et al. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau ( $\tau$ ) in Alzheimer cytoskeletal pathology. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n. 13, p. 4913–4917, 1986.
- GUERREIRO, R. J.; GUSTAFSON, D. R.; HARDY, J. The genetic architecture of Alzheimer's disease: beyond APP, PSENs and APOE. **Neurobiology of aging**, v. 33, n. 3, p. 437–456, 2012.
- HAASS, C. et al. Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. **Nature**, v. 359, n. 6393, p. 322, 1992.
- HALL, J. A. et al. The sirtuin family's role in aging and age-associated pathologies.



- The Journal of clinical investigation**, v. 123, n. 3, p. 973–979, 2013.
- HALLIWELL, B. Biochemical mechanisms accounting for the toxic action of oxygen on living organisms: the key role of superoxide dismutase. **Cell biology international reports**, v. 2, n. 2, p. 113–128, 1978.
- HAN, Y. et al. Combination of plasma biomarkers and clinical data for the detection of sporadic Alzheimer's disease. **Neuroscience letters**, v. 516, n. 2, p. 232–236, 2012.
- HARDY, J. A.; HIGGINS, G. A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. **Science**, v. 256, n. 5054, p. 184, 1992.
- HENRY, W.; QUERFURTH, H. W.; LAFERLA, F. M. Mechanisms of disease Alzheimer's disease. **New Engl J Med**, v. 362, p. 329–344, 2010.
- HERRMANN, W.; KNAPP, J.-P. Hyperhomocysteinemia: a new risk factor for degenerative diseases. **Clinical laboratory**, v. 48, n. 9–10, p. 471–481, 2001.
- HERSKOVITS, A. Z.; GUARENTE, L. SIRT1 in neurodevelopment and brain senescence. **Neuron**, v. 81, n. 3, p. 471–483, 2014.
- HIPPIUS, H.; NEUNDORFER, G. The discovery of Alzheimer's disease. **Dialogues in clinical neuroscience**, v. 5, p. 101–108, 2003.
- HOEKMAN, M. F. M. et al. Spatial and temporal expression of FoxO transcription factors in the developing and adult murine brain. **Gene Expression Patterns**, v. 6, n. 2, p. 134–140, 2006.
- JACK, C. R. et al. Shapes of the trajectories of 5 major biomarkers of Alzheimer disease. **Archives of neurology**, v. 69, n. 7, p. 856–867, 2012.
- JULIEN, C. et al. Sirtuin 1 reduction parallels the accumulation of tau in Alzheimer disease. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 68, n. 1, p. 48–58, 2009.
- KALSHEKER, N. A.  $\alpha$ 1-antichymotrypsin. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 28, n. 9, p. 961–964, 1996.
- KAMBOH, M. I. et al. A4POE\* 4-associated Alzheimer's disease risk is modified by  $\alpha$ 1-antichymotrypsin polymorphism. **Nature genetics**, v. 10, n. 4, p. 486–488, 1995.
- KANG, J. et al. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. **Nature**, v. 325, n. 6106, p. 733–736, 1987.
- KARRAN, E.; MERCKEN, M.; DE STROOPER, B. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. **Nature reviews Drug discovery**, v. 10, n. 9, p. 698–712, 2011.
- KHAN, G. et al. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease report of NINCDS-ADRD

work group under the auspices of Department of Health and Human services Task Force on Alzheimer's disease. **Neurology**, v. 34, p. 939–944, 1984.

KIM, T.-W. et al. Alternative cleavage of Alzheimer-associated presenilins during apoptosis by a caspase-3 family protease. **Science**, v. 277, n. 5324, p. 373–376, 1997.

KUMAR-SINGH, S. et al. Dense-core plaques in Tg2576 and PSAPP mouse models of Alzheimer's disease are centered on vessel walls. **The American journal of pathology**, v. 167, n. 2, p. 527–543, 2005.

KUMAR-SINGH, S. et al. Mean age-of-onset of familial Alzheimer disease caused by presenilin mutations correlates with both increased A $\beta$ 42 and decreased A $\beta$ 40. **Human mutation**, v. 27, n. 7, p. 686–695, 2006.

KUNG, H. F. **The  $\beta$ -amyloid hypothesis in Alzheimer's disease: seeing is believing**ACS Publications, , 2012.

LAM, E.-F.; FRANCIS, R. E.; PETKOVIC, M. **FOXO transcription factors: key regulators of cell fate**Portland Press Limited, , 2006.

LAMBERT, J.-C. et al. Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. **Nature genetics**, v. 45, n. 12, p. 1452–1458, 2013.

LAMBRACHT-WASHINGTON, D. et al. Evaluation of a DNA A $\beta$ 42 vaccine in adult rhesus monkeys (*Macaca mulatta*): antibody kinetics and immune profile after intradermal immunization with full-length DNA A $\beta$ 42 trimer. **Alzheimer's Research & Therapy**, v. 9, n. 1, p. 30, 2017.

LANNERT, H.; HOYER, S. Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long-term diminutions in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats. **Behavioral neuroscience**, v. 112, n. 5, p. 1199, 1998.

LAXTON, A. W. et al. A phase I trial of deep brain stimulation of memory circuits in Alzheimer's disease. **Annals of neurology**, v. 68, n. 4, p. 521–534, 2010.

LEE, S. S. et al. DAF-16 target genes that control *C. elegans* life-span and metabolism. **Science**, v. 300, n. 5619, p. 644–647, 2003.

LIN, M. T.; BEAL, M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Nature**, v. 443, n. 7113, p. 787–795, 2006.

LIPPENS, G. et al. Tau aggregation in Alzheimer's disease: what role for phosphorylation? **Prion**, v. 1, n. 1, p. 21–25, 2007.

LIU, C.-C. et al. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. **Nature Reviews Neurology**, v. 9, n. 2, p. 106–118, 2013.

- LORENZO, A.; YANKNER, B. A. Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 25, p. 12243–12247, 1994.
- LOURENCO, M. V; FERREIRA, S. T.; DE FELICE, F. G. Neuronal stress signaling and eIF2 $\alpha$  phosphorylation as molecular links between Alzheimer's disease and diabetes. **Progress in neurobiology**, v. 129, p. 37–57, 2015.
- LOVESTONE, S. et al. Alzheimer's disease-like phosphorylation of the microtubule-associated protein tau by glycogen synthase kinase-3 in transfected mammalian cells. **Current Biology**, v. 4, n. 12, p. 1077–1086, 1994.
- LUZARDO, A. R.; GORINI, M. I. P. C.; SILVA, A. P. S. S. DA. Características de idosos com doença de Alzheimer e seus cuidadores: uma série de casos em um serviço de neurogeriatria. **Texto & contexto enfermagem. Florianópolis. Vol. 15, n. 4 (out./dez. 2006), p. 587-594**, 2006.
- M DE LA MONTE, S. Brain insulin resistance and deficiency as therapeutic targets in Alzheimer's disease. **Current Alzheimer Research**, v. 9, n. 1, p. 35–66, 2012.
- MAHLEY, R. W. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. **Science**, v. 240, n. 4852, p. 622, 1988.
- MAHLEY, R. W.; HUANG, Y.; RALL, S. C. Pathogenesis of type III hyperlipoproteinemia (dysbetalipoproteinemia): questions, quandaries, and paradoxes. **Journal of lipid research**, v. 40, n. 11, p. 1933–1949, 1999.
- MAHLEY, R. W.; RALL JR, S. C. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. **Annual review of genomics and human genetics**, v. 1, n. 1, p. 507–537, 2000.
- MARCHESI, V. T. Alzheimer's dementia begins as a disease of small blood vessels, damaged by oxidative-induced inflammation and dysregulated amyloid metabolism: implications for early detection and therapy. **The FASEB Journal**, v. 25, n. 1, p. 5–13, 2011.
- MARKESBERY, W. R. The role of oxidative stress in Alzheimer disease. **Archives of neurology**, v. 56, n. 12, p. 1449–1452, 1999.
- MARTYN, C. N. et al. Aluminum concentrations in drinking water and risk of Alzheimer's disease. **Epidemiology**, p. 281–286, 1997.
- MASTERS, C. L. et al. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 82, n. 12, p. 4245–4249, 1985.
- MATTSON, M. P. et al. Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-

regulating roles for secreted forms of the  $\beta$ -amyloid precursor protein. **Neuron**, v. 10, n. 2, p. 243–254, 1993.

MATTSON, M. P. Gene–diet interactions in brain aging and neurodegenerative disorders. **Annals of Internal Medicine**, v. 139, n. 5\_Part\_2, p. 441–444, 2003.

MATTSON, M. P.; SHEA, T. B. Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. **Trends in neurosciences**, v. 26, n. 3, p. 137–146, 2003.

MAYEUX, R. Epidemiology of neurodegeneration. **Annual review of neuroscience**, v. 26, n. 1, p. 81–104, 2003.

MCCADDON, A. et al. Total serum homocysteine in senile dementia of Alzheimer type. **International journal of geriatric psychiatry**, v. 13, n. 4, p. 235–239, 1998.

MECOCCI, P.; MACGARVEY, U.; BEAL, M. F. Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease. **Annals of neurology**, v. 36, n. 5, p. 747–751, 1994.

MENZEL, H. J.; KLADETZKY, R. G.; ASSMANN, G. Apolipoprotein E polymorphism and coronary artery disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 3, n. 4, p. 310–315, 1983.

MICHAN, S.; SINCLAIR, D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. **Biochemical Journal**, v. 404, n. 1, p. 1–13, 2007.

MIRRA, S. S. et al. The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD) Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. **Neurology**, v. 41, n. 4, p. 479, 1991.

MIURA, T. et al. Metal binding modes of Alzheimer's amyloid  $\beta$ -peptide in insoluble aggregates and soluble complexes. **Biochemistry**, v. 39, n. 23, p. 7024–7031, 2000.

MOMS, J. C. et al. The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part I. Clinical and neuropsychological assesment of Alzheimer's disease. **Neurology**, v. 39, n. 9, p. 1159, 1989.

MORRIS, M. S. Homocysteine and Alzheimer's disease. **The Lancet Neurology**, v. 2, n. 7, p. 425–428, 2003.

MÜLLER, U. C.; DELLER, T.; KORTE, M. Not just amyloid: physiological functions of the amyloid precursor protein family. **Nature Reviews Neuroscience**, 2017.

NABUURS, R. J. A. et al. MR Microscopy of Human Amyloid- $\beta$  Deposits: Characterization of Parenchymal Amyloid, Diffuse Plaques, and Vascular Amyloid. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 34, n. 4, p. 1037–1049, 2013.

- NATHAN, B. P. et al. Differential Effects of Apolipoproteins E3 and E4. **Science**, v. 264, p. 6, 1994.
- NELSON, P. T. et al. Alzheimer's disease is not "brain aging": neuropathological, genetic, and epidemiological human studies. **Acta neuropathologica**, v. 121, n. 5, p. 571–587, 2011.
- NICHOLLS, D. G. Oxidative stress and energy crises in neuronal dysfunction. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1147, n. 1, p. 53–60, 2008.
- NITRINI, R. et al. Performance of illiterate and literate nondemented elderly subjects in two tests of long-term memory. **Journal of the International Neuropsychological Society**, v. 10, n. 04, p. 634–638, 2004.
- NITRINI, R. et al. Influence of age, gender and educational level on performance in the Brief Cognitive Battery-Edu. **Dementia & Neuropsychologia**, v. 2, n. 2, p. 114–118, 2008.
- NIXON, R. A.; MATHEWS, P. M.; CATALDO, A. M. The neuronal endosomal-lysosomal system in Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 3, n. 1, p. 97–107, 2001.
- NOGUEIRA, S. L. et al. Distribuição espacial e crescimento da população idosa nas capitais brasileiras de 1980 a 2006: um estudo ecológico. **Revista Brasileira de Estudos de população**, v. 25, n. 1, p. 195–198, 2008.
- NOZIK-GRAYCK, E.; SULIMAN, H. B.; PIANTADOSI, C. A. Extracellular superoxide dismutase. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 37, n. 12, p. 2466–2471, 2005.
- NUNOMURA, A. et al. Neuronal death and survival under oxidative stress in Alzheimer and Parkinson diseases. **CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)**, v. 6, n. 6, p. 411–423, 2007.
- ORTIZ, G. G. et al. Chapter One-Oxidative Stress: Love and Hate History in Central Nervous System. **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**, v. 108, p. 1–31, 2017.
- OUTEIRO, T. F.; MARQUES, O.; KAZANTSEV, A. Therapeutic role of sirtuins in neurodegenerative disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1782, n. 6, p. 363–369, 2008.
- PARK, C. R. et al. Intracerebroventricular insulin enhances memory in a passive-avoidance task. **Physiology & behavior**, v. 68, n. 4, p. 509–514, 2000.

- PARVATHY, S. et al. Cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by  $\alpha$ -secretase occurs at the surface of neuronal cells. **Biochemistry**, v. 38, n. 30, p. 9728–9734, 1999.
- PASINETTI, G. M. et al. Caloric intake and Alzheimer's disease. In: **Mechanisms of Dietary Restriction in Aging and Disease**. [s.l.] Karger Publishers, 2007. v. 35p. 159–175.
- PIKE, S. T. et al. Mitochondrial C1-tetrahydrofolate synthase (MTHFD1L) supports the flow of mitochondrial one-carbon units into the methyl cycle in embryos. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 7, p. 4612–4620, 2010.
- PINO, E. et al. FOXO3 determines the accumulation  $\alpha$ -synuclein and controls the fate of dopaminergic neurons in the substantia nigra. **Human molecular genetics**, p. ddt530, 2013.
- PORCELLINI, E. et al. Elevated Plasma Levels of  $\alpha$ -1-Anti-Chymotrypsin in Age-Related Cognitive Decline and Alzheimer's Disease: A Potential Therapeutic Target. **Current pharmaceutical design**, v. 14, n. 26, p. 2659–2664, 2008.
- PRINCE, M. et al. World Alzheimer report 2016: improving healthcare for people living with dementia: coverage, quality and costs now and in the future. 2016.
- PRINCE, M. J. **World Alzheimer Report 2014: dementia and risk reduction: an analysis of protective and modifiable factors**. [s.l.: s.n.].
- RAJAH, M. N. et al. Family history and APOE4 risk for Alzheimer's Disease impact the neural correlates of episodic memory by early midlife. **NeuroImage: Clinical**, v. 14, p. 760, 2017.
- RITCHIE, A.; MORGAN, K.; KALSHEKER, N. Allele-specific overexpression in astrocytes of an Alzheimer's disease associated alpha-1-antichymotrypsin promoter polymorphism. **Molecular brain research**, v. 131, n. 1, p. 88–92, 2004.
- ROYSTON, M. C. et al. Apolipoprotein E [epsilon] 2 allele promotes longevity and protects patients with Down's syndrome from dementia. **Neuroreport**, v. 5, n. 18, p. 2583–2585, 1994.
- SAHIN, P. et al. The cell survival kinase SGK1 and its targets FOXO3a and NDRG1 in aged human brain. **Neuropathology and applied neurobiology**, v. 39, n. 6, p. 623–633, 2013.
- SAITO, H. et al. Effects of polymorphism on the lipid interaction of human apolipoprotein E. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 42, p. 40723–40729, 2003.

- SANKAR, T. et al. Deep brain stimulation influences brain structure in Alzheimer's disease. **Brain stimulation**, v. 8, n. 3, p. 645–654, 2015.
- SAYRE, L. M. et al. In situ oxidative catalysis by neurofibrillary tangles and senile plaques in Alzheimer's disease. **Journal of neurochemistry**, v. 74, n. 1, p. 270–279, 2000.
- SCHELTENS, P. et al. Efficacy of a medical food in mild Alzheimer's disease: A randomized, controlled trial. **Alzheimer's & Dementia**, v. 6, n. 1, p. 1–10, 2010.
- SCHNEIDER, J. A. et al. **Alzheimer's Disease: Modernizing Concept, Biological Diagnosis and Therapy**. S. Karger AG. Anais...2012
- SELKOE, D. J. Amyloid  $\beta$ -protein and the genetics of Alzheimer's disease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 31, p. 18295–18298, 1996.
- SELKOE, D. J. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. **Physiological reviews**, v. 81, n. 2, p. 741–766, 2001.
- SELKOE, D.; MANDELKOW, E.; HOLTZMAN, D. Deciphering alzheimer disease. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 2, n. 1, p. a011460, 2012.
- SESHADRI, S. et al. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. **New England Journal of Medicine**, v. 346, n. 7, p. 476–483, 2002.
- SEVIGNY, J. et al. The antibody aducanumab reduces A $\beta$  plaques in Alzheimer's disease. **Nature**, v. 537, n. 7618, p. 50–56, 2016.
- SHARIATI, S. A. M.; DE STROOPER, B. Redundancy and divergence in the amyloid precursor protein family. **FEBS letters**, v. 587, n. 13, p. 2036–2045, 2013.
- SHAW, L. M. et al. Cerebrospinal fluid biomarker signature in Alzheimer's disease neuroimaging initiative subjects. **Annals of neurology**, v. 65, n. 4, p. 403–413, 2009.
- SHEA, T. B.; LYONS-WEILER, J.; ROGERS, E. Homocysteine, folate deprivation and Alzheimer neuropathology. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 4, n. 4, p. 261–267, 2002.
- SHERRINGTON, R. et al. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. **Nature**, v. 375, n. 6534, p. 754, 1995.
- SHI, C. et al. Cdk5–Foxo3 axis: initially neuroprotective, eventually neurodegenerative in Alzheimer's disease models. **J Cell Sci**, v. 129, n. 9, p. 1815–1830, 2016.
- SILVERMAN, G. A. et al. The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins: Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. **Journal of Biological Chemistry**, 2001.

- SINHA, S. et al. Purification and cloning of amyloid precursor protein  $\beta$ -secretase from human brain. **Nature**, v. 402, n. 6761, p. 537–540, 1999.
- SMITH, J. S. et al. A phylogenetically conserved NAD<sup>+</sup>-dependent protein deacetylase activity in the Sir2 protein family. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 12, p. 6658–6663, 2000.
- SMITH, M. A. et al. Test for oxidative damage in Alzheimer's. **Nature**, v. 382, p. 120–121, 1996.
- SMITH, M. A. et al. Amyloid- $\beta$  Deposition in Alzheimer Transgenic Mice Is Associated with Oxidative Stress. **Journal of neurochemistry**, v. 70, n. 5, p. 2212–2215, 1998.
- SMITH, M. DE A. C. Doença de Alzheimer. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 21, p. 3–7, 1999.
- SONNEN, J. A. et al. Free radical-mediated damage to brain in Alzheimer's disease and its transgenic mouse models. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 45, n. 3, p. 219–230, 2008.
- STRASSNIG, M.; GANGULI, M. About a peculiar dis-ease of the cerebral cortex. **Psychiatry**, v. 2, p. 30–33, 2005.
- STRITTMATTER, W. J. et al. Hypothesis: microtubule instability and paired helical filament formation in the Alzheimer disease brain are related to apolipoprotein E genotype. **Experimental neurology**, v. 125, n. 2, p. 163–171, 1994.
- STYREN, S. D.; KAMBOH, M. I.; DEKOSKY, S. T. Expression of differential immune factors in temporal cortex and cerebellum: The role of  $\alpha$ -1-antichymotrypsin, apolipoprotein E, and reactive glia in the progression of Alzheimer's disease. **Journal of Comparative Neurology**, v. 396, n. 4, p. 511–520, 1998.
- SWERDLOW, R. H.; BURNS, J. M.; KHAN, S. M. The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: progress and perspectives. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1842, n. 8, p. 1219–1231, 2014.
- SWERDLOW, R. H.; KHAN, S. M. A “mitochondrial cascade hypothesis” for sporadic Alzheimer's disease. **Medical hypotheses**, v. 63, n. 1, p. 8–20, 2004.
- SZABLEWSKI, L. Glucose Transporters in Brain: In Health and in Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 55, n. 4, p. 1307–1320, 2017.
- SZARUGA, M. et al. Qualitative changes in human  $\gamma$ -secretase underlie familial Alzheimer's disease. **Journal of Experimental Medicine**, p. jem-20150892, 2015.



- TAGLIARI, B. et al. Homocysteine increases neuronal damage in hippocampal slices receiving oxygen and glucose deprivation. **Metabolic brain disease**, v. 21, n. 4, p. 273–278, 2006.
- TALBOT, K. et al. Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. **The Journal of clinical investigation**, v. 122, n. 4, p. 1316–1338, 2012.
- TANZI, R. E.; BERTRAM, L. Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. **Cell**, v. 120, n. 4, p. 545–555, 2005.
- THOMAS, P.; FENECH, M. A review of genome mutation and Alzheimer's disease. **Mutagenesis**, v. 22, n. 1, p. 15–33, 2006.
- TORACK, R. M. **The early history of senile dementia Alzheimer's disease**The Free Press, New York, , 1983.
- TZIVION, G.; DOBSON, M.; RAMAKRISHNAN, G. FoxO transcription factors; Regulation by AKT and 14-3-3 proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1813, n. 11, p. 1938–1945, 2011.
- VAN DAM, F.; VAN GOOL, W. A. Hyperhomocysteinemia and Alzheimer's disease: A systematic review. **Archives of gerontology and geriatrics**, v. 48, n. 3, p. 425–430, 2009.
- VAN GIAU, V. et al. Role of apolipoprotein E in neurodegenerative diseases. **Neuropsychiatric disease and treatment**, v. 11, p. 1723, 2015.
- VANESSA DE JESUS, R. et al. Vol. 3 n° 3-Jul/Aug/Set de 2009. [s.d.].
- VASSAR, R. et al.  $\beta$ -Secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. **science**, v. 286, n. 5440, p. 735–741, 1999.
- WAKE, H. et al. Microglia: actively surveying and shaping neuronal circuit structure and function. **Trends in neurosciences**, v. 36, n. 4, p. 209–217, 2013.
- WANG, X. et al. Genetic variation in a 1-antichymotrypsin and its association with Alzheimer's disease. **Human genetics**, v. 110, n. 4, p. 356–365, 2002.
- WELANDER, H. et al. A $\beta$ 43 is more frequent than A $\beta$ 40 in amyloid plaque cores from Alzheimer disease brains. **Journal of neurochemistry**, v. 110, n. 2, p. 697–706, 2009.
- WHITEHOUSE, P. The challenges of cognitive aging: Integrating approaches from science to intergenerational relationships. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 36, n. 2, p. 225–232, 2013.
- WHITMER, R. A. et al. Body mass index in midlife and risk of Alzheimer disease and vascular dementia. **Current Alzheimer Research**, v. 4, n. 2, p. 103–109, 2007.

- WIENER, H. W. et al. A polymorphism in SOD2 is associated with development of Alzheimer's disease. **Genes, Brain and Behavior**, v. 6, n. 8, p. 770–776, 2007.
- WISCHIK, C. M. et al. Isolation of a fragment of tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 12, p. 4506–4510, 1988.
- YAN, R. et al. Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease  $\beta$ -secretase activity. **Nature**, v. 402, n. 6761, p. 533–537, 1999.
- YEO, G.; GALLAGHER-THOMPSON, D. **Ethnicity and the dementias**. [s.l.] Taylor & Francis, 2006.
- ZECCA, L. et al. Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 5, n. 11, p. 863–873, 2004.
- ZETTERBERG, H. Applying fluid biomarkers to Alzheimer's disease. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, p. ajpcell-00007, 2017.
- ZHAO, X.-C. et al. Regulation of the FOXO3a/Bim signaling pathway by 5, 7-dihydroxy-8-nitrochrysin in MDA-MB-453 breast cancer cells. **Oncology letters**, v. 5, n. 3, p. 929–934, 2013.
- ZHONG, L. et al. A rapid and cost-effective method for genotyping apolipoprotein E gene polymorphism. **Molecular neurodegeneration**, v. 11, n. 1, p. 2, 2016.
- ZHONG, N.; WEISGRABER, K. H. Understanding the association of apolipoprotein E4 with Alzheimer disease: clues from its structure. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 10, p. 6027–6031, 2009.
- ZHU, X. et al. Causes of oxidative stress in Alzheimer disease. **Cellular and molecular life sciences**, v. 64, n. 17, p. 2202, 2007.

### **Considerações Finais**

Nossa pesquisa foi importante para caracterização de genes relacionados a doença de Alzheimer e ajudaram na busca de novos Biomarcadores úteis para o diagnóstico precoce e tratamento individualizado.

## APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Universidade Federal do Espírito Santo, Departamento Ciências Biológicas / CCHN

#### I - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA:

Estudo genético e de instabilidade genômica da doença Alzheimer em pacientes de Vitória – ES.

**Pesquisador responsável:** Flavia de Paula

**Descrição:** Atualmente as pessoas estão vivendo por mais tempo e isso fez com que um grande número de indivíduos venha a desenvolver algumas doenças relacionadas com a idade, entre elas a doença Alzheimer. Esta doença não tem causa conhecida, mas pode ser influenciada por fatores ambientais (fumo, obesidade, doenças cardiovasculares, diabetes etc.) e fatores genéticos (características herdadas dos nossos pais). Nossa pesquisa pretende estudar as causas genéticas da doença Alzheimer, para isto nós vamos estudar genes relacionados com a doença na população de Vitória, ES. É importante falar que este é um estudo voluntário, ou seja, o(a) senhor(a) não é obrigado(a) a participar deste estudo. Contudo, a sua participação nesta pesquisa é muito importante, pois os resultados gerados a partir desta pesquisa podem dar informações que auxiliem no desenvolvimento de futuras estratégias de estudo da doença Alzheimer em nossa população. Quem quiser participar desta pesquisa precisa preencher este termo de consentimento. Além disto, nós vamos coletar 20 mL de sangue dos voluntários que concordarem em participar da pesquisa.

#### Avaliação do risco da pesquisa:

( ) sem risco            (x) risco mínimo            ( ) risco médio            ( ) risco maior

O risco mínimo se refere à eventual possibilidade de hematoma (roxo ou vermelhidão) e/ou dor mínima na região da coleta de sangue.

#### II – DIREITOS E GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

O(a) senhor(a) não é obrigado(a) a participar desta pesquisa. Os participantes que quiserem participar têm acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para fazer perguntas que esclareçam dúvidas. O(a) senhor(a) pode retirar seu consentimento a qualquer momento e a não adesão a este projeto de pesquisa não implicará em prejuízo de qualquer natureza. **Asseguramos que as amostras de seu DNA não serão utilizadas para fins de direito civil e penal (investigação criminal ou identificação humana para paternidade e**

**maternidade), mas apenas para os fins descritos no presente protocolo de pesquisa.** Não haverá ônus (gastos) para os participantes da pesquisa. Os resultados desta pesquisa serão divulgados na comunidade científica, contudo a identidade dos participantes não será revelada preservando a confidencialidade, sigilo e privacidade do participante. Não estão previstas formas de ressarcimento ou indenizações durante a pesquisa. Os participantes que concordarem em participar da pesquisa deverão preencher o Termo de Consentimento Livre Esclarecido.

### **III – INFORMAÇÕES SOBRE OS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA:**

Referências: Flavia de Paula.

Endereço: Laboratório de Genética Humana e Molecular (NGHM), Departamento de Ciências Biológicas CCHN/UFES, Av. Marechal Campos 1468, Campus de Maruípe, Vitória - ES, CEP: 29.043-900, Telefone: (27) 2122-7255

### **IV- DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA.**

NOME			
TELEFONE			
DATA NASCIMENTO		IDADE	SEXO <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> F
ENDEREÇO			
ETNIA		ESCOLARIDADE	

#### **Responsável legal (se necessário):**

NOME		
IDADE		GRAU DE PARENTESCO
TELEFONE		

### **V – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO**

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente protocolo de pesquisa.

- ( ) Desejo conhecer os resultados dessa pesquisa  
 ( ) Não desejo conhecer os resultados dessa pesquisa

Local e data

--

Assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

--

Assinatura do pesquisador responsável (Flavia de Paula)

--

Caso o(a) senhor(a) tenha dificuldade em entrar em contato com o pesquisador responsável, comunique o fato à Comissão de Ética em Pesquisa da EMESCAM (coordenador: Elisardo Corral Vasquez) pelo telefone 3334-3586, pelo e-mail [comite.etica@emescam.br](mailto:comite.etica@emescam.br) ou pelo seguinte endereço: Av. Nossa Senhora da Penha, 2190, Santa Luiza - Vitória - ES - 29045-402.

## APÊNDICE B – Questionário de Saúde Pessoal

(de acordo com modelo recomendado por: International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens: considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutat Res*, v. 204, p. 379-406, 1998, com adaptações)

### HISTÓRIA PESSOAL

■ Data

■ Qual a sua idade?  anos

■ Sexo  Masculino  Feminino

■ A qual grupo étnico o(a) Sr(a) pertence?

- Caucasiano  
 Negro  
 Oriental  
 Indígena  
 Outro. Qual?

■ Qual o seu estado civil?

- Casado  
 Solteiro  
 Separado  
 Divorciado  
 Viúvo  
 Não informado

■ De quantos filhos o(a) Sr(a) é pai (mãe) natural (isto é, não inclua filhos adotados e de criação e inclua filhos que moram separadamente)?

■ Qual é a renda mensal de sua família?  salários.

■ Qual a sua escolaridade?

- Sem escolaridade  
 Ensino fundamental  
 Ensino médio  
 Educação superior  
 Não informado

### HISTÓRIA OCUPACIONAL

■ Qual é o seu local de trabalho?

■ Há quanto tempo o(a) Sr(a) trabalha nesse local?

■ Se há menos de dez anos, onde o(a) Sr(a) trabalhou previamente e por quanto tempo?

■ Que tipo de trabalho o(a) Sr(a) faz?

■ Qual é a sua carga horária de trabalho?

### EXPOSIÇÃO

■ Liste os agentes químicos (por exemplo, gases tóxicos, benzeno, chumbo, fármacos, agrotóxicos etc) ou físicos (radiação) a que o(a) Sr(a) se expôs nos últimos 10 anos em seu trabalho.

Nos últimos 10 anos

Quantas vezes por mês?

Nos últimos 12 meses

Quantas vezes por mês?

■ O(a) Sr(a) usa algum tipo de proteção?

SIM Qual?

NÃO

### HISTÓRIA DE FUMO

■ Alguma vez o(a) Sr(a) fumou?

SIM e não fuma atualmente

Por quanto tempo o(a) Sr(a) fumou?  anos

Há quanto tempo parou de fumar?  anos

O que fumou?

Cigarro

Charuto

Cachimbo

Quantos cigarros (ou charutos ou cachimbos) o(a) Sr(a) fumava por dia?

SIM e fuma atualmente

O que fuma?

Cigarro

Charuto

Cachimbo

Quantos cigarros (ou charutos ou cachimbos) o(a) Sr(a) fuma por dia?

NÃO, e não convive com fumantes.

NÃO, mas convive com fumantes.

### MEDICAMENTOS E DOENÇAS

■O(a) Sr(a) tem tomado algum medicamento prescrito pelo médico, no último ano (por exemplo, comprimidos para pressão, insulina, tranquilizantes, relaxantes musculares, antidepressivos etc.)?

- NÃO  
 SIM

Medicamento

Dose

Duração do tratamento

■O(a) Sr(a) tomou algum medicamento no último ano (por exemplo, aspirina, antiácido, anti-histamínicos, sedativos ou outras drogas)?

- NÃO  
 SIM

Medicamento

Dose

Duração do tratamento

■O(a) Sr(a) tomou alguma vitamina nos últimos 6 meses?

- NÃO  
 SIM

Medicamento

Dose

Duração do tratamento

■O(a) Sr(a) teve alguma dessas doenças?

- Câncer Tipo
- Hepatite
- Mononucleose
- Herpes
- AIDS
- Meningite
- Infecção bacteriana ou viral
- Doença cardiovascular
- Diabete
- Doença renal crônica
- Doença de Parkinson
- Doença Alzheimer Tempo desde o diagnóstico
- Outra(s) doença(s) importante(s)

■Liste as vacinações que o (a) Sr (a) recebeu nos últimos 12 meses.

Vacina

Data



■Liste os raios-X diagnósticos e terapêuticos recebidos nos últimos 12 meses.

Razão para o raio-X

Data (ano)



- O(a) Sr(a) passou por alguma cirurgia durante o último ano?

Motivo

Data



### HÁBITOS ALIMENTARES FREQUENTES

- O(a) Sr(a) come apenas vegetais?

SIM

NÃO

- O(a) Sr(a) come carne?

NÃO

SIM. Com que frequência?

Dias por semana

1 a 2

3 a 4

5 a 6

todos os dias

Carne bovina


Peixe

Frango

Porco

Outras

- O(a) Sr(a) usa adoçantes?

NÃO

SIM. Quantas vezes ao dia?

- O(a) Sr(a) bebe refrigerantes?

NÃO

SIM. Quantas vezes por semana?

- O(a) Sr(a) toma café?

NÃO

SIM. Quantas xícaras pequenas por dia?

- O(a) Sr(a) bebe chá?

NÃO

SIM. Quantas xícaras pequenas por dia?

- O(a) Sr(a) toma chimarrão?

NÃO

SIM. Com que frequência?

- O(a) Sr(a) bebe cerveja?

NÃO

SIM. Qual a sua média de consumo semanal?

menos de uma garrafa por semana

1-6 garrafas por semana

7-12 garrafas por semana

13-24 garrafas por semana

mais de 24 garrafas por semana. Quantas?

- O(a) Sr(a) bebe vinho?

NÃO

SIM. Qual a sua média de consumo semanal:

- 1-4 copos por semana ou menos  
 5-8 copos por semana  
 9-16 copos por semana  
 mais de 16 copos por semana. Quantos?

■O(a) Sr(a) bebe outras bebidas alcoólicas (excluindo cerveja e vinho)?

- NÃO  
 SIM. Qual ou quais?

Por favor, indique sua média de consumo semanal

Comente sobre sua dieta, caso ela tenha algo de especial (por exemplo, dieta rica em proteínas e pobre em carboidratos etc).

■O(a) Sr(a) pratica alguma atividade física?

- NÃO  
 SIM. Qual?

Com que frequência?

## HISTÓRIA GENÉTICA

■O(a) Sr(a) tem conhecimento de algum defeito de nascimento ou outra desordem genética ou doença hereditária que tenha afetado seus pais, irmãos, irmãs ou seus filhos?

- NÃO  
 SIM. Qual?

■A Sra teve ou tem dificuldade para engravidar?

- NÃO  
 SIM. Especifique.

■O(a) Sr(a) já teve filho nascido prematuramente ou que tenha sido abortado?

- NÃO  
 SIM

■O(a) Sr(a) tem um gêmeo idêntico vivo?

- NÃO  
 SIM

