



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

LUCAS HENRIQUE GONZAGA DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO GENE CASS4 NA BUSCA DE BIOMARCADORES
DE DIAGNÓSTICO DA VIA INFLAMATÓRIA DA DOENÇA DE
ALZHEIMER**

VITÓRIA, ES

2020

LUCAS HENRIQUE GONZAGA DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO GENE CASS4 NA BUSCA DE BIOMARCADORES
DE DIAGNÓSTICO DA VIA INFLAMATÓRIA DA DOENÇA DE
ALZHEIMER**

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

Orientadora: Profa. Dra. Flávia de Paula

VITÓRIA, ES

2020

LUCAS HENRIQUE GONZAGA DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO GENE CASS4 NA BUSCA DE BIOMARCADORES
DE DIAGNÓSTICO NA VIA INFLAMATÓRIA DA DOENÇA DE
ALZHEIMER**

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

Apresentada as 14:00 hs no dia 06 de julho de 2020

Profa. Dra. Flavia de Paula

Universidade Federal do Espírito Santo

Orientadora

Profa. Dra. Flavia Imbroisi Valle Errera

Universidade Federal do Espírito Santo

Profa. Dra. Débora Dummer Meira

Universidade Federal do Espírito Santo

Membro externo

VITÓRIA, ES

2020

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

G642a Gonzaga de Oliveira, Lucas Henrique, 1995-
AVALIAÇÃO DO GENE CASS4 NA BUSCA DE BIOMARCADORES DE DIAGNÓSTICO DA VIA INFLAMATÓRIA DA DOENÇA DE ALZHEIMER / Lucas Henrique Gonzaga de Oliveira. - 2020.
68 f. : il.

Orientadora: Flávia de Paula.

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

1. Doença de Alzheimer. 2. Biomarcadores. 3. Estudo de associação Caso-Controlle. 4. Genes de risco. 5. Genes associados a doença de Alzheimer. 6. Gene CASS4. I. de Paula, Flávia. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família e amigos, pois sem vocês, eu não seria quem sou hoje.

AGRADECIMENTOS

Antes de qualquer agradecimento, expresso aqui a minha imensa gratidão a Deus, por ter me concedido forças pra seguir até onde cheguei. Cada tropeço nesta caminhada da vida, é uma lição, e sou grato a todas elas.

Expresso minha gratidão ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, local de excelente formação acadêmica. A todos os excelentes professores e contribuintes deste processo, meu muito obrigado. Em especial a Mírian, nossa querida secretária, sempre disposta a nos auxiliar nos momentos de dificuldade.

Um agradecimento mais que especial, a querida professora Flávia de Paula, que embarcou comigo nesta jornada, tornando possível que eu continuasse minha caminhada e me oportunizando adentrar no universo da doença de Alzheimer. A você, professora Flávia, minha eterna gratidão.

A querida Jucimara, colega e amiga de laboratório, sempre muito paciente e disposta a compartilhar seu conhecimento, sempre com muita paciência e doçura nos momentos de ensinamento.

A todos os colegas do NGHM, Affonso, Taís, Carla, Isabele, que me auxiliaram nos momentos de práticas de laboratório, e até mesmo nos momentos de descontração. Em especial, agradeço também a Maira, que me ensinou a realizar a PCR, e me oportunizou uma autonomia pra que eu pudesse conduzir meu experimento.

Aos meus amigos que fiz durante minha caminhada nesta vida, em especial a Verlúcia, pessoa sem igual e mais que uma grande amiga, uma irmã que a vida me deu. Por último, a minha família, sem a qual eu não teria motivos pra realizar cada passo nessa jornada fora de casa.

Agradeço imensamente a CAPES, órgão que fomentou minha bolsa de pesquisa, sem a qual, seria inviável a realização deste trabalho, bem como a UFES, CNPQ e FAPES por todo o suporte dado para a realização desta e de outras pesquisas.

RESUMO

OLIVEIRA, L. H. G. 2020. 68f. **AVALIAÇÃO DO GENE CASS4 NA BUSCA DE BIOMARCADORES DE DIAGNÓSTICO DA VIA INFLAMATÓRIA DA DOENÇA DE ALZHEIMER.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo. Brasil.

As demências são um grupo que contempla patologias neurodegenerativas, levando a degradação dos neurônios de forma irreversível, gerando perda progressiva de cognição e capacidade de associação de memórias, onde, com o avanço deste processo, é gerada dependência com desgaste psicológico imenso, à família. A doença de Alzheimer esporádica (DAE) é a forma mais comum dentre as patologias neurodegenerativas, onde a etiologia da doença ainda não foi totalmente esclarecida. A identificação de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) associados a esta doença tem sido uma estratégia utilizada na tentativa de elucidar as vias bioquímicas que ocasionam tal doença. Estas variáveis podem ser úteis no futuro como biomarcadores de diagnóstico. O presente trabalho, analisou o polimorfismo rs911159 CASS4, onde o alelo A, foi implicado ao risco de declínio cognitivo em pacientes de uma população asiática. O gene CASS4 codifica uma proteína envolvida com a via inflamatória que pode estar relacionada com a DAE. A fim de se verificar o efeito desta variante na população de pacientes de Vitória-ES, foi conduzido um estudo de associação caso: controle, onde os genótipos dos participantes da pesquisa, foram obtidos pela técnica de PCR-RFLP. A pesquisa foi conduzida com 74 pacientes com diagnóstico provável de DAE e 69 indivíduos saudáveis. Os resultados da presente pesquisa sugerem que o genótipo GA do SNP rs911159 do gene CASS4 atua como fator de proteção contra a DAE em pacientes do ES. O genótipo AA não foi encontrado na amostra analisada, provavelmente, devido ao pequeno número amostral. Este resultado é de suma importância, devido a escassez de estudos de associação genética com este polimorfismo e devido a necessidade da busca de biomarcadores para a doença de Alzheimer.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer; gene CASS4; Biomarcadores de diagnóstico.

ABSTRACT

OLIVEIRA, L. H. G. 2020. 68f. **EVALUATION OF THE CASS4 GENE IN THE SEARCH FOR DIAGNOSTIC BIOMARKERS OF THE INFLAMMATORY ROUTE OF ALZHEIMER'S DISEASE.** Dissertation (Master in Biotechnology) - Graduate Program in Biotechnology, UFES, Espírito Santo. Brazil.

Dementias are a group that contemplates neurodegenerative pathologies, leading to neuronal degradation irreversibly, generating progressive loss of cognition and ability to associate memories, where, with the progress of this process, dependence is generated with immense psychological wear and tear on the family. Sporadic Alzheimer's disease (AED) is the most common form among neurodegenerative pathologies, where the etiology of the disease has not yet been fully clarified. The identification of single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with this disease has been a strategy used in an attempt to elucidate the biochemical pathways that cause this disease. These variables may be useful in the future as diagnostic biomarkers. The present study analyzed the rs911159 CASS4 polymorphism, where the A allele, was implicated in the risk of cognitive decline in patients from an Asian population. The CASS4 gene encodes a protein involved with the inflammatory pathway that may be related to AED. In order to verify the effect of this variant on the population of patients in Vitória-ES, a case: control association study was conducted, where the genotypes of the research participants were obtained by the PCR-RFLP technique. The research was conducted with 74 patients with a probable diagnosis of AED and 69 healthy individuals. The results of this research suggest that the GA genotype of SNP rs911159 of the CASS4 gene acts as a protective factor against AED in ES patients. The AA genotype was not found in the sample analyzed, probably due to the small sample size. This result is of paramount importance, due to scarcity of studies of genetic association with this polymorphism and due to the need to search for biomarkers for Alzheimer's disease.

Keywords: Alzheimer's disease; geneCASS4; Diagnostic biomarkers.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Desenhos de preparações histológicas do material de Auguste D, através de coloração de Prata, demonstrando emaranhados, e seus estágios, do artigo de Alzheimer - (A) Início da doença; (B) estágio avançado; e (C) estado terminal da doença.....19
- Figura 2. Ilustração comparativa do cérebro de um indivíduo saudável e outro com Doença de Alzheimer.....24
- Figura 3. A, placas neuríticas (senis) difusas e adjacentes umas às outras com depósitos extracelulares de proteína β -amilóide em marron e depósitos intracelulares de proteínas Tau hiperfosforiladas, emparelhadas heicoidalmente. Em B, esquema do peptídeo β -amilóide e proteína Tau emparelhada.....24
- Figura 4. Regiões do cérebro, mais afetadas pela DA.....26
- Figura 5: Processamento da APP pelas vias não amiloidogênicas e amiloidogênicas.....28
- Figura 6. Efeitos da clivagem de app em peptídeo b-amiloide com capacidade de formação de oligômeros e autoagregação em placas extracelulares, levando a disfunção sináptica e morte neuronal.....30
- Figura 7. Representação de micróglia patrulhando o ambiente cerebral e atuando na depuração do peptídeo $A\beta$ excessivo.....34

Figura 8: Cromossomos e as respectivas posições dos principais genes relacionados ao Alzheimer 2007).....	42
Figura 9: Genes e loci de risco, associados a doença de Alzheimer.....	43
Figura 10: Rede de sinalização gerada por ativação de integrinas pelo peptídeo A β Adaptado de (BECK et al., 2014).....	46
Figura 11: respectivos fragmentos gerados após clivagem enzimática e seus padrões de banca obtidos através de eletroforese em gel de policrilamida a 8%, corado com nitrato de prata.	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tabela 1: Perfis gerados pelo Sistema de classificação A + T + (N), agrupando perfis como não portadores de Alzheimer, indivíduos no continuum de Alzheimer (possíveis portadores) e Portadores de Alzheimer.....	39
Tabela 2. Características da amostra.....	53
Tabela 3. Análise de frequências de genótipos e regressão logística de rs911159 CASS4.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A β 42 Peptídeo β amilóide de aminoácido 42

A β 40 Peptídeo β amilóide de 40 aminoácidos

ADRDA Alzheimer's Disease and Related Disorders Association

APOE Apolipoproteína E

APP Proteína Precursora Amilóide

BACE1 β site APP cleaving enzyme 1

BLAST Basic Local Alignment Search Tool

CD2AP CD2-associated protein

CRAI Centro de Referência de Atendimento ao Idoso

CT83 Fragmento residual C-terminal de 83 aminoácidos

CT99 Fragmento residual C-terminal de 99 aminoácidos

CT5759 Fragmento C-terminal de 57 à 59

DA Doença de Alzheimer

DAE Doença de Alzheimer Esporádica

DAF Doença de Alzheimer Familiar

EH-W Equilíbrio de Hardy-Weinberg

GWAS Genome-wide association study

HSCMV Hospital Santa Casa de Misericórdia de Vitória

IC Intervalo de confiança

LCR Líquido cefalorraquidiano

MAPT Microtubule-associated protein Tau

CASS4 CasScaffold Protein member 4 AMMSE

NCBI National Center for Biotechnology Information

NGHM Núcleo de Genética Humana e Molecular

NINCDS National Institute of Neurological and Communicative Disorders and

OR Odds ratio

OEGE Online Encyclopedia for Genetic Epidemiology studies

PSNE1 Presenilina 1

PSEN2 Presenilina 2

PCR Polymerase Chain Reaction

PET Positron Emission Tomography

PIB-PET Pittsburgh compound B- PET

RFLP Restriction Fragment Length Polymorphism

sAPP α Peptídiosolúvel APP α

sAPP β Peptídiosolúvel APP β aminoácidos

SNP Single Nucleotide Polymorphism

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 HISTÓRICO.....	17
2.2 EPIDEMIOLOGIA A DIAGNÓSTICO NA DOENÇA DE ALZHEIMER.....	20
2.3 FISIOPATOLOGIA E HIPÓTESES NA DA.....	23
2.4 PEPTÍDIO BETA AMILÓIDE.....	27
2.5 PROTEÍNA Tau.....	30
2.6 NEUROINFLAMAÇÃO NA DA.....	32
2.7 BIOMARCADORES E DIAGNÓSTICO NA DA.....	36
2.8 GENÉTICA DA DOENÇA DE ALZHEIMER.....	40
2.8.1. GENE CASS4.....	44
2.9. TRATAMENTO	46
3 OBJETIVOS	48
3.1 OBJETIVO GERAL.....	48
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	48
4 METODOLOGIA	49
4.1 ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO.....	49
4.2 ANÁLISE GENOTÍPICA.....	50
4.2.1 ANÁLISE ESTATÍSTICA	52
5 RESULTADOS	53
6 DISCUSSÃO	55
7 CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS	

1. INTRODUÇÃO

É notável, que nas últimas décadas houve um crescimento populacional, associado a um aumento da expectativa de vida da população em geral (BURLÁ; CAMARANO, 2010). Isto ocorreu, graças ao avanço científico e melhora nas políticas públicas de acesso a saúde ocorrida nas últimas décadas (BURLÁ; CAMARANO, 2010).

O envelhecimento da população é um fenômeno mundial (CARVALHO; COUTINHO, 2002). No Brasil, as pessoas com 60 anos ou mais representavam 5% da população geral em 1940 (CARVALHO; COUTINHO, 2002). Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2000 cerca de 8,6% da população era idosa. A organização mundial de saúde (OMS) estimou no ano de 2010, que a faixa etária dos 60 anos ou mais, correspondiam a cerca de 754,6 milhões de indivíduos, e as estimativas são de que em 2025, 1,2 bilhões de pessoas estejam nesta faixa etária, e em 2050, esta população corresponderá a 22% do total mundial (BURLÁ; CAMARANO, 2010; CUSTODIO et al., 2017; GUTIERREZ et al., 2014).

Em menos de 40 anos, houve no Brasil, um aumento da expectativa de vida, sendo observada maior incidência e prevalência de doenças crônico-degenerativas (VERAS; SÃO; XAVIER, 2009; GUTIERREZ et al., 2014).

As demências integram um grupo que contempla patologias neurodegenerativas, levando a degradação dos neurônios de forma irreversível (SANTOS et al., 2016), gerando incapacidade de Julgamento e aprendizagem, perda de cognição e orientação, além da capacidade de associação de memórias, a depender do grau de progressão destas patologias (CACACE; SLEEGERS; BROECHOVEN, 2016; SANTOS et al., 2016). Com o avanço deste processo, é gerada uma dependência de familiares ou cuidadores, aumentando despesas financeiras e ocasionando um desgaste psicológico, à família e a envolvidos (CARLOS; PEREIRA, 2015; SANTOS et al., 2016).

A doença de Alzheimer (DA) é a forma mais comum dentre as patologias neurodegenerativas, (PIMENOVA et al, 2018). Tal doença pode ser classificada em

maior ou menor grau, existindo portadores em estado inicial com baixo ou nenhum comprometimento significativo da memória e das habilidades físicas, motoras e intelectuais, enquanto outros em um estado mais tardio, apresentam quadro demencial, não respondendo por si, e apresentando momentos de descontrole (SANTOS et al., 2016; VIDOR et al., 2019). Tal doença representa cerca de 60% a 80% dos casos de demência em todo o mundo (THOMAS & FENECH, 2007; VIDOR et al., 2019).

A Doença de Alzheimer de início tardio ou doença de Alzheimer Esporádica (LOAD – Late Onset Alzheimer’s Disease ou DAE) manifesta-se após os 65 anos de idade, e está se tornando cada vez mais prevalente em todo o mundo. Suas determinantes genéticas ou ambientais, ainda não foram totalmente esclarecidas (MORRIS, ET AL., 2014; ROSENTHAL & KAMBOH, 2014). Até o momento, nenhum tratamento efetivo foi desenvolvido para essa doença (HICKMAN; FAUSTIN; WISNIEWSKI, 2016; CARLOS & PEREIRA, 2015).

Histologicamente, a doença de Alzheimer é caracterizada pela agregação de peptídios β -amilóide extracelularmente e depósitos intracelulares de proteína TAU hiperfosforilada, ocasionando redução e disfunção sináptica com consequente morte do neurônio, grande atrofia cerebral, estresse oxidativo, neuroinflamação, distúrbios na reentrada do ciclo celular, metabolismo anormal do colesterol e alterações vasculares (BECK, NICOLAS, KOPP, & GOLEMIS, 2014; CALSOLARO & EDISON, 2016; KARCH & GOATE, 2015; PIMENOVA, RAJ, & GOATE, 2018). Dada a complexidade dos processos patológicos intrínsecos a esta doença, torna-se difícil o diagnóstico precoce, aumentando os custos e dificuldades com estes indivíduos acometidos por DA (I et al., 2016).

Estudos de associação ampla do genoma (*Genome Wide Association Study* - GWAS) têm sido realizados em pacientes afetados pela doença e controles não acometidos por esta patologia, a partir de tecnologias de análises genéticas, onde são feitas comparações, dos polimorfismos encontrados em cada grupo amostral (Pacientes e Controles saudáveis), a fim de se relacionar variantes genéticas a chances de risco de desenvolvimento de DA (KUNKLE et al., 2019; OLAZAR, 2013). Habitualmente, são utilizados polimorfismos de nucleotídeo único (*single nucleotide*

polymorphism - SNPs), que possibilitam a associação destes polimorfismos com agentes responsáveis pela origem de algumas doenças (OLAZAR, 2013).

Com as dificuldades no diagnóstico da DAE, e a ausência de tratamentos efetivos, os estudos com biomarcadores genéticos vêm se tornando uma prática de grande auxílio para a detecção de variantes associadas ao risco de desenvolvimento ou proteção ao Alzheimer (FRIDMAN ET AL., 2004; SMITH, 2017; KHAN, T. K., 2018;). Até o momento, a principal associação de risco genético a DAE, foi atribuída a variantes em *APOE*. A isoforma $\epsilon 4$, está associada ao risco de DA com Odds ratio de 3 e 12 em heterozigotos e homozigotos, respectivamente. No entanto, o alelo $\epsilon 3$ e $\epsilon 2$ associam-se a proteção contra DA (FRIDMAN ET AL., 2004; LANE, HARDY, & SCHOTT, 2017).

Nos últimos anos, esforços têm sido realizados para identificar outros SNPs associados a DAE, e polimorfismos no gene *CASS4* foram associados ao risco de desenvolvimento de Alzheimer e em alguns casos, à diminuição do risco ou associação com efeitos mais brandos desta doença (BEECHAM et al., 2014; HAROLD et al., 2009; KUNKLE, et al., 2019; LAMBERT et al., 2009). Um estudo realizado com pacientes de Taiwan identificou associação positiva do polimorfismo rs911159 *CASS4* com DAE (LIN et al., 2017). Devido às variações genéticas populacionais serem grandes, estes estudos carecem de ser confirmados em outras populações, sustentando a importância desta ferramenta biotecnológica, possibilitando que em um futuro não tão distante, exames genéticos, possam se tornar uma rotina médica, auxiliando na detecção e tratamento de doenças.

Desta forma, o presente estudo teve por objetivo analisar a associação do polimorfismo rs911159 *CASS4* em um estudo de associação caso: controle em pacientes da grande Vitória-ES, com objetivo de, no futuro, estes resultados serem úteis na seleção de biomarcadores de diagnóstico para a DAE.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Histórico

O termo demência é muito antigo, e é derivado da palavra Latina *demens*, que significa sem mente (CIPRIANI, Gabriele et al., 2011; YANG et al., 2016). Tal palavra adquiriu uma conotação médica no início do século XVIII, mas a condição de declínio cognitivo relacionado à idade, já era citada, na antiga Grécia (YANG et al., 2016), onde, desde muito cedo, estudiosos como Pitágoras, Sólon, Hipéridos, Isócrates, Hipócrates e Platão (428-347 aC), (460-370 aC) já faziam referência a debilidade relacionada a pessoas de idade avançada (PAPAVRAMIDOU, 2018), admitindo que a demência era fundamentalmente ocasionada pela velhice (YANG et al., 2016).

Marcus Tullius Cicero (106-43 aC), filósofo, político e jurista em Roma, discordava deste pensamento e associava a demência a pessoas com pouca força de vontade, não sendo então uma consequência inevitável da idade (CICERO, 1923). Pitágoras, médico grego do século VII a.C, criou uma divisão do ciclo de vida começando aos 7, 21, 49, 63 e 81 anos de idade, onde estes dois últimos foram designados como o *Senium*, ou “velhice”, período caracterizado pela regressão e decadência das capacidades mentais (N. C.; C. W., 1998; YANG et al., 2016).

Inúmeras terminologias foram aplicadas a demência ao longo do passado, como “estupidez”, “letargia” e “insensibilidade” (N. C.; C. W., 1998). No século XVIII, o termo demência ainda causava alguma certa confusão, descrevendo um estado de déficit intelectual adquirido, em qualquer idade e causa, podendo ser atribuída a um jovem que tenha sido acometido por graves ferimentos na cabeça (CIPRIANI, G.; DANTI; CARLESI, 2016; YANG et al., 2016).

Philippe Pinel (1745-1826) famoso médico francês, com a ajuda de seu assistente, Jean Etienne Esquirol (1772–1840), classificou a demência senil, e esta começou a ser diferenciada de outras desordens, sendo estabelecida em uma nova categoria de doença (CIPRIANI et al., 2011). Criou-se então, grupos de disfunções mentais: melancolia, mania, demência e retardo mental (CIPRIANI et al., 2011).

Esquirol introduziu uma observação clínica sistemática, identificando novas categorias e subtipos de transtornos mentais, estabelecendo uma base para a

classificação moderna da doença mental, distinguindo demência e amentia (ou idiotice) cuja a primeira, refere-se a perda das faculdades mentais em detrimento de uma patologia (CIPRIANI, Gabriele et al., 2011).

Alguns pesquisadores contribuíram fortemente para a caracterização etiológica deste complexo de doenças através das manifestações clínicas e patologias cerebrais associadas (CIPRIANI, G.; DANTI; CARLESI, 2016).

A demência é uma das principais causas de sofrimento e incapacidade em idosos com sintomas neuropsiquiátricos co-mórbidos, como agitação, desorientação espacial, apatia, delírios e comportamentos incomuns, síndromes de identificação incorreta e comportamento semelhante a sociopatia (CIPRIANI, G.; DANTI; CARLESI, 2016).

Dentre os pesquisadores das síndromes demenciais, destacamos Aloysius Alzheimer, que nasceu em Marktbriet, Alemanha, em 14 de junho de 1864 (THOMAS; FENECK, 2007). Este, dedicou-se as atividades de pesquisa, graduando-se médico psiquiatra na Universidade de Berlin (LEIBING, 1998; YANG et al., 2016).

De 1888 a 1903, Alzheimer trabalhou como residente médico e depois como médico sênior no asilo mental municipal em Frankfurt, onde ele forjou sua amizade com Franz Nissl, que desenvolveu técnicas de colorações histopatológicas do tecido nervoso, permitindo o estudo histológico de vários distúrbios neurodegenerativos (THOMAS; FENECK, 2007).

Em 3 de Novembro de 1906, durante uma palestra na 37ª Conferência de Psiquiatras do Sudoeste Alemão em Tübingen, ele apresentou o trabalho intitulado “*“Einen eigenartigen schweren Erkrankung prozess der Hirnrinde”*” descrevendo as características clínicas e neuropatológicas da paciente Auguste D (Deter), que morreu em Frankfurt em 8 de abril de 1906, com 56 anos de idade (GOEDERT; GHETTI, 2007). Os sintomas demenciais da paciente Auguste Deter, manifestaram-se aos 51 anos, e por cerca de oito meses ela vinha desenvolvendo mudanças progressivas em sua personalidade (CASTELLANI; ROLSTON; SMITH, 2010). Surgiram ideias de inveja para com o marido, uma fraqueza de memória que se agravou rapidamente, falta de interesses anteriores e acentuada deterioração psicossocial, sintomas

psicóticosse descontrola (CIPRIANI, Gabriele et al., 2011; GOEDERT; GHETTI, 2007; YANG et al., 2016).

Em 8 de abril de 1906, a paciente veio a óbito, em decorrência de uma septicemia, tendo seu Cérebro sido encaminhado para autópsia, revelando uma atrofia difusa de todo o cérebro além de mudanças características em suas estruturas internas (YANG et al., 2016). Por meio técnicas de coloração a base de Prata, Alzheimer analisou e identificou agregações de fibrilas (emaranhados neurofibrilares) e o que ele chamou de 'focos miliares' (placas amilóides) no córtex cerebral, caracterizando como Demência Senil, onde a figura 1 descreve a patologia encontrada na paciente, por Alzheimer (YANG et al., 2016).



Figura 1: Desenhos de preparações histológicas do material de Auguste D, através de coloração de Prata, demonstrando emaranhados, e seus estágios, do artigo de Alzheimer - (A) Início da doença; (B) estágio avançado; e (C) estado terminal da doença. Adaptado de (ENGELHARDT; DA MOTA GOMES, 2015).

Apesar de tais alterações já haverem sido observadas em outros cérebros post-mortem, Alzheimer foi o primeiro a relacioná-las à demência de seu paciente (LEIBING, 1998). A idade jovem, a rápida progressão da Doença, o perfil neuropatológico e a gravidade das lesões, não permitiram uma caracterização mais precisa da doença, na época (LEIBING, 1998; YANG et al., 2016).

Emil Kraepelin (1856-1926), diretor da *Royal Psychiatric Clinic* em Munique, tentava relacionar anormalidades estruturais no cérebro às síndromes demenciais dos pacientes (THOMAS; FENECH, 2007). Ele cunhou o termo doença de Alzheimer ao incluí-lo na edição de 1910 (8ª edição) de seu famoso livro sobre Psiquiatria Clínica descrevendo uma forma particularmente grave de demência senil com início precoce da doença de Alzheimer (THOMAS; FENECH, 2007).

A Doença de Alzheimer é a forma mais comum de demência, de início insidioso, que leva a danos cerebrais progressivos com consequente perda de cognição e memória, incapacidade funcional dos pacientes, quadros psicóticos e perda de função motora, com consequente morte do paciente, ocasionada por tal degeneração, onde o falecimento costuma ocorrer entre 6 e 12 anos após o início da doença, normalmente por uma complicação da imobilidade ou por embolia pulmonar e pneumonia (HARDMAN et al, 1996;BALLARD et al., 2011; CUSTODIO et al., 2017).

2.2. Epidemiologia e Diagnóstico na Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer, principal causa de demência na população idosa, é caracterizada por perda progressiva de memória e funções cognitivas (HUANG & MUCKE, 2012). A doença, apresenta duas subformas. Estas são classificadas quanto a um limiar de idade de aparecimento dos sinais clínicos, antes ou após os 65 anos, sendo a Doença de Alzheimer de início precoce (EOAD – *Early Onset Alzheimer's Disease*), a forma que é manifesta entre os 40 a 50 anos de idade.

A EOAD, é relacionada a mutações autossômicas hereditárias nos genes *APP*, *PSEN1* e *PSEN2*, com forte penetrância e histórico familiar, havendo casos com início dos sintomas entre 30 a 50 anos (CACACEA; SLEEGERSA; BROECKHOVEN, 2016).

A doença de Alzheimer de início Tardio ou doença de Alzheimer esporádica (LOAD - *Late Onset Alzheimer's Disease - DAE doença de Alzheimer esporádica*) apresenta sinais após os 65 anos de idade, sendo associada a múltiplos genes e fatores ambientais, sendo a forma mais prevalente (CASTELLANI; ROLSTON; SMITH, 2010). Porém, alguns estudos consideram que a doença, seja uma única entidade, mais comum após os 65 anos (CASTELLANI; ROLSTON; SMITH, 2010; CACACEA; SLEEGERSA; BROECKHOVEN, 2016).

Os fatores de risco já conhecidos para a DA incluem a idade, escolaridade, trauma craniano, hipertensão arterial, hiperlipidemia, diabetes, acidente vascular cerebral, hábitos alimentares e fatores genéticos, ainda não totalmente esclarecidos (VIDOR et al., 2019). Em 2000, os casos de DA, correspondiam a 60,33%, dos casos

totais de demência, sendo observado um aumento em 2010 (64,13%), havendo um crescimento de 5,4 vezes no sexo masculino e 6,3 vezes no sexo feminino (VIDOR et al., 2019).

A incidência da DAE aumenta com a idade, duplicando a cada cinco anos (CASTELLANI; ROLSTON; SMITH, 2010). Estima-se que cerca de 58% dos casos ocorram em pessoas com idade mais avançada, e em países subdesenvolvidos ou de baixo desenvolvimento econômico (HARRIS, 2019).

Devido a alterações na urbanização, natalidade e mortalidade ocorridas nas últimas oito décadas, houveram mudanças no perfil demográfico brasileiro, evidenciando um crescente envelhecimento populacional (VIDOR et al., 2019). Segundo o IBGE, em 2005, a população brasileira com mais de 60 anos, correspondia a 9,8% da população, e em 2015, essa população correspondia a 14,3% da população total do país (IBGE, 2016). Espera-se que em 2070, a parcela da população idosa brasileira, seja 35,0% acima da população total, com uma expectativa de vida em torno de 78,2 anos para homens e de 84,5 anos para as mulheres (IBGE, 2016). Com tais mudanças demográficas, observou-se uma redução de doenças infecciosas e um aumento de doenças crônicas não transmissíveis (VIDOR et al., 2019). Foi percebido um crescimento de síndromes demenciais no Brasil, associando-se ao envelhecimento (DSM, 2013).

No Brasil, a taxa de mortalidade por DA no ano 2000 foi de 9,38 óbitos por milhão de habitantes, 56,28 óbitos para cada milhão em 2010, sendo notável uma maior incidência de mortes por DA no sexo feminino (VIDOR et al., 2019). A DAE acomete cerca de 46 milhões de pessoas (CONDELLO; STÖEHR, 2018).

A prevalência de afetados mundialmente subiu de 24 milhões em 2001, para 46,8 milhões em 2015 implicando em 1,5 milhões de novos casos por ano, mundialmente (HARRIS, 2019). Estudos apontam que a prevalência dobrará a cada 20 anos, e em meados de 2040, será esperado 80 milhões de pacientes afetados com demência (HARRIS, 2019), e para 2050 um número de 131,5 milhões de indivíduos afetados (HICKMAN; FAUSTIN; WISNIEWSKI, 2016). Embora os riscos associados ao desenvolvimento da DA sejam multifatoriais, o fator de risco mais importante é, de

longe, o envelhecimento (ESIRI, 2012). O risco de desenvolver DAE, aumenta a cada 5 anos após os 65 anos de idade (HARRIS, 2019).

Alguns estudos perceberam algumas diferenças entre os gêneros, sendo maior o risco de incidência e as taxas de progressão da doença em mulheres, e um pouco menor em homens, sendo de 1,06% em homens e 1,36% em mulheres, assim como, o risco de desenvolvimento é aumentado, em populações de países subdesenvolvidos, havendo uma relação do risco com as taxas de escolaridade. Com base em critérios de comprometimento cognitivo e alterações comportamentais, os pacientes podem ser diagnosticados clinicamente com uma precisão, ainda considerada baixa, entre 60 e 70% (LEDERMAN, 2000). As orientações para elaboração dos critérios diagnósticos para a DA, são aquelas delineados pelo Instituto Nacional de Distúrbios Neurológicos e Comunicativos e Associação de Desordens Relacionadas à Doença de Alzheimer (NINCDS – AD & DA).

Em sua última atualização, os critérios definidos por este órgão, orientam a categorização dos pacientes, com base em perfis patológicos, definidos pelo status dos biomarcadores da *Proteína (p) B-Amiloide*, *(p) Tau hiperfosforilada*, e os danos morfológicos no cérebro, obtidos através de estudos de neuroimagem, como forma de agrupamento dos pacientes em perfis, como *paciente não Alzheimer*, *paciente no Continuum do Alzheimer*, e *paciente com outras patologias relacionadas a DA* (JACK JR, 2018).

É necessário realizar exames laboratoriais para excluir sinais de anemia e infecção, como a Neurosífilis que também pode ocasionar quadros demenciais (THOMAS; FENECK, 2007). Foi desenvolvida outra técnica que envolve o uso de um composto amiloidofílico intravenoso marcado com ^{19}F , que em modelos murinos, permitiu a detecção de placas amilóides especificamente marcadas, permitindo a visualização dos depósitos amilóides, fornecendo apoio diagnóstico mais precoce (HIGUCHI et al, 2005). Porém, apenas a autópsia do tecido cerebral, permite a confirmação precisa de DA.

2.3. Fisiopatologia e hipóteses na DA

Na patologia da DA, são observadas alterações macroscópicas e microscópicas no encéfalo, ocorrendo atrofia cortical difusa, degeneração neurovascular, perdas neuronais além de sinapses comprometidas e reduzidas, existência de placas senis extracelulares formadas por filamentos de proteína β -amilóide ($A\beta$) agregadas e também, emaranhadas neurofibrilares intracelulares, formados principalmente pela proteína Tau (SERRANO-POZO et al, 2011; MAGALHÃES, 2017). Também ocorre redução de células gliais, responsáveis pelo patrulhamento do ambiente cerebral, além de diminuição do volume encefálico (AVERSI-FERREIRA; RODRIGUES; PAIVA et al., 2008).

As placas senis são compostas por proteína $A\beta$, a qual é gerada a partir da clivagem anômala da proteína precursora amilóide ou *APP (Amyloid Protein Precursor)* (BELCAVELLO, 2014). Os emaranhados neurofibrilares (NFT, *neurofibrillary tangles*, na sigla em inglês), são lesões internas ao neurônio, onde filamentos de proteína Tau hiperfosforilada, tendem ao emparelhamento. Essa proteína é importante para a manutenção, formando emaranhados intracelulares, desestabilizando o citoesqueleto e comprometendo a homeostase neuronal, culminando na morte de neurônios (BELCAVELLO, 2014).

A figura 2 exhibe as principais alterações cerebrais macroscópicas associadas a indivíduos afetados por DA em comparação a cérebros saudáveis.

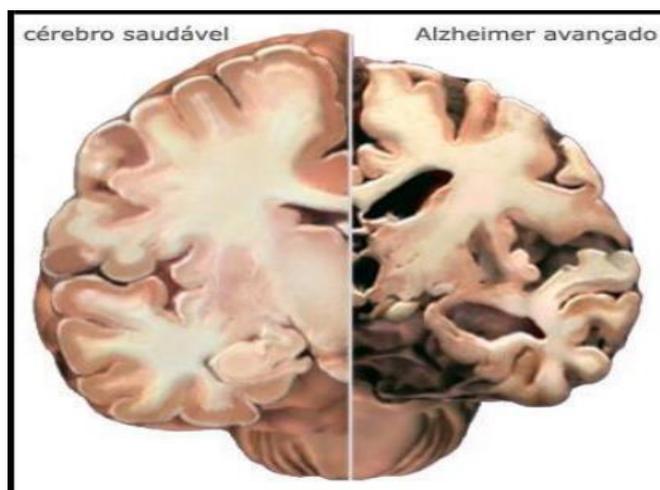


Figura 2. Ilustração comparativa do cérebro de um indivíduo saudável e outro com Doença de Alzheimer. Adaptado de National Institute of Aging- www.nia.nih.gov/alzheimers/scientificimages

Na figura 3, é exibido um esquema de neurônios de indivíduos afetados por Alzheimer, evidenciando um acúmulo placas neuríticas (PN), e emaranhados neurofibrilares (ENF) intracelulares da proteína Tau hiperfosforilada (BALLARD et al., 2011).

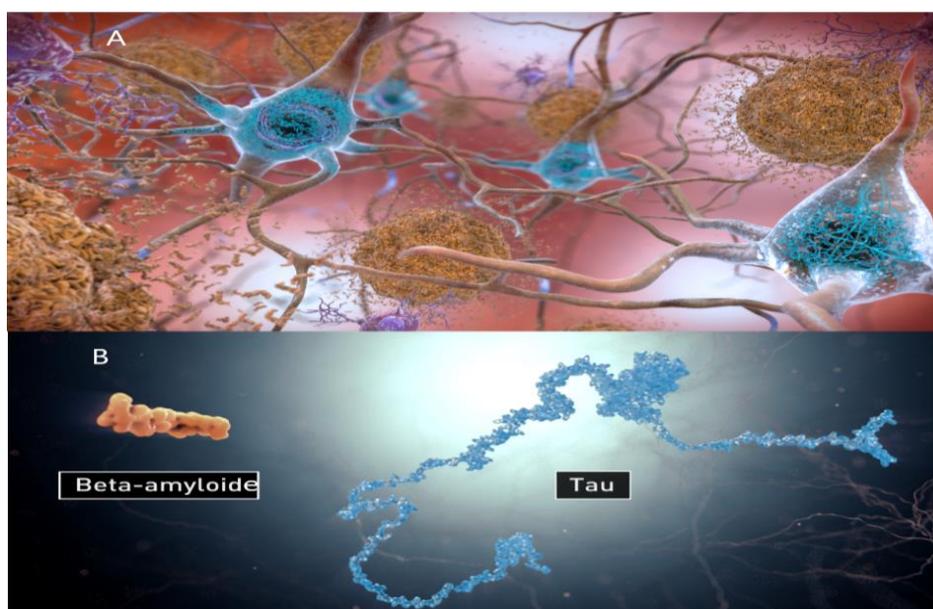


Figura 3. Em A, placas neuríticas (senis) difusas e adjacentes umas às outras com depósitos extracelulares de proteína β -amilóide em marrom e depósitos intracelulares de proteínas Tau hiperfosforiladas, emparelhadas heicoidalmente. Em B, esquema do peptídeo β -amilóide e proteína Tau emparelhada. Adaptado de National Institute of Aging www.nia.nih.gov/alzheimers/scientific-images

As placas neutíticas e emaranhados neurofibrilares são encontrados principalmente nas amídalas cerebelosas, no hipocampo e no córtex entorrinal do lóbulo temporal enquanto as porções parietais e frontais do córtex associativo são afetadas em menor intensidade (SERRANO-POZO et al, 2011). Além destes sinais, é possível observar estresse oxidativo difundido no cérebro, neuroinflamação, desregulação de cálcio, deficiência e distribuição alterada das mitocôndrias, oligomerização do peptídeo A β , toxicidade sináptica e problemas na homeostase metálica, em pacientes acometidos por DA (SERRANO-POZO et al, 2011).

A idade de início da doença está relacionada ao avanço da atrofia cortical, mais pronunciada em pacientes de início precoce (início abaixo dos 65 anos), enquanto nos casos tardios, a atrofia central é mais elevada (HAM DAN, 2008). Encontra-se também em nível de alterações macroscópicas, a atrofia dos bulbos e tratos olfatórios e o encolhimento do hipocampo, neste caso, com aumento do corno temporal dos ventrículos laterais (HAM DAN, 2008).

As placas senis são depósitos extracelulares, compactos e esféricos, cercados por terminações nervosas danificadas, onde agregados de A β , (compostas por amiloides, astrócitos e células microgliais), são encontrados tanto em dendritos como em axônios (TAN; GLEESSON, 2019). As placas senis estão localizadas nos lobos temporal, parietal, frontal, na amígdala, hipocampo e no córtex piriforme (HAM DAN, 2008; MARTELLI; MARTELLI, 2014).

Já nos emaranhados de neurofibrilas, a proteína Tau, sofre uma fosforilação excessiva, onde um desbalanço da atividade de fosfatases, geram peptídios Tau em excesso, levando a agregação destes peptídios, emparelhadamente, formando os emaranhados neurofibrilares, com posterior desestruturação do arcabouço celular, onde tal degradação projeta-se no hipocampo, interrompendo os processos de aprendizagem e de associação de memória de curto prazo, passando por regiões paralímbicas, até o neocortex (THOMAS; FENECK, 2007; HAM DAN, 2008). A figura 4, exhibe as principais regiões cerebrais afetadas na patologia da DA.

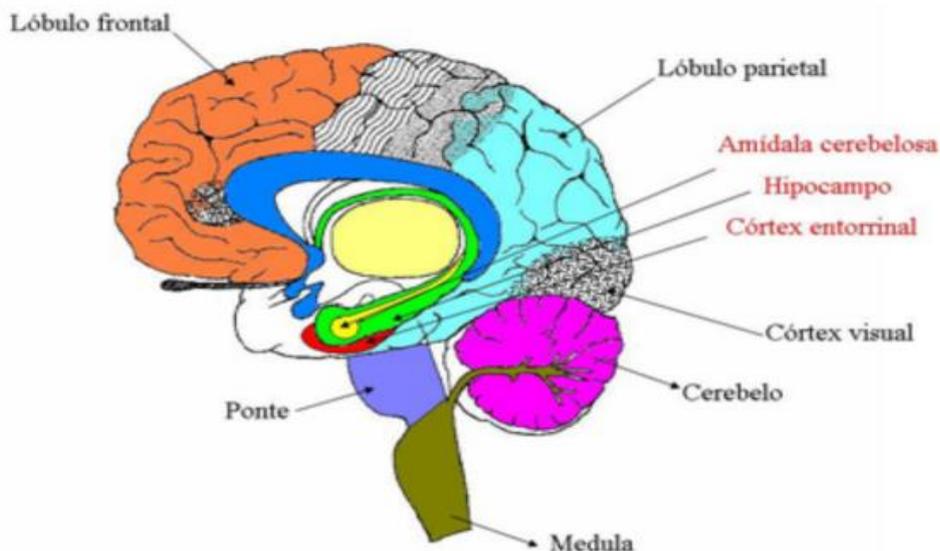


Figura 4: Regiões do cérebro, mais afetadas pela DA em vermelho. Adaptado de (ALMEIDA e SANTOS, 2018).

Com o avanço da doença, ocorre um aumento no volume ventricular, alargamento dos sulcos cerebrais, sendo mais pronunciado no lóbulo temporal, com atrofia cortical variável (MARTELLI; MARTELLI, 2014). Com o avanço da DA, ocorre uma grande perda neuronal com redução do volume do órgão (THOMAS; FENECK, 2007).

A gravidade da DA está correlacionada mais fortemente com os fusos neurofibrilares do que com a presença das placas senis (COELHO et al., 2009). A presença de tal quadro histopatológico, relaciona-se com o aparecimento de alterações na função cognitiva, que atingem, em especial, a memória, a capacidade de aprendizagem e associação de informações.

O diagnóstico da presença dessas lesões somente é possível através do exame microscópico do tecido cerebral por autópsia, realizada em exame pós-mortem, enfatizando a necessidade de alternativas de diagnóstico *in vivo* (MARTELLI; MARTELLI, 2014).

2.4. Peptídeo β -amilóide

Os depósitos extracelulares de de peptídeo A β , são um importante sinal histopatológico na DA, devido ao fato, deste peptídeo agregar-se em placas, na porção extracelular dos neurônios, onde essa deposição é considerada um evento central nesta patologia (DE FALCO et al, 2011).

A APP é uma proteína transmembrana de tipo 1 altamente conservada, pertencente a uma pequena família proteica, que inclui proteínas homólogas a APP, como *APLP1* e *APLP2*, onde a APP contribui em funções fisiológicas essenciais em vários estágios do desenvolvimento neuronal (TAN; GLEESON, 2019).

As proteínas da família APP possuem um grande domínio extracelular, um domínio transmembrana de passagem única e uma cauda citoplasmática curta, e embora APP e APLPs compartilhem regiões conservadas, a seqüência A β está presente exclusivamente em APP (TAN; GLEESON, 2019; THOMAS; FENECH, 2007).

A APP é codificada por um único gene localizado no cromossomo 21, e o *splicing* alternativo origina três isoformas principais, APP751 e APP770 expressas no cérebro e junções musculares, e a isoforma APP695 que é predominantemente expressa no cérebro. Percebeu-se em indivíduos com trissomia do 21, que era mais comum o surgimento de sintomas demenciais associados a níveis elevados de de A β (THOMAS; FENECH, 2007).

Alguns íons metálicos são moduladores da cascata amilóide (CHEIGNON, C. et al, 2018). Metais como o Zinco, Ferro e Cobre, foram encontrados em placas amiloides e fora percebido, que estes, podem ligar-se ao peptídeo, e assim modular o processo de agregação, induzindo formas mais tóxicas, além de poder produzir espécies reativas de oxigênio (EROS), prejudiciais para o peptídeo A β e biomoléculas adjacentes (CHEIGNON, C. et al, 2018).

Segundo a hipótese amilóide, a deposição do peptídeo A β_{40-42} em excesso, pode ser resultado de mutações de troca de sentido no gene *APP*, ocasionando uma desregulação no processamento enzimático, elevando os níveis β -amilóide $_{40-42}$, havendo então, a ativação microglial em excesso, liberação demasiada de citocinas,

ativação crônica da resposta imune e grande stress oxidativo no ambiente cerebral (KINNEY et al., 2018; THOMAS; FENECH, 2007; TAN; GLEESON, 2019).

Postula-se que a clivagem anormal da proteína transmembrânica APP, resulta em peptídeos $A\beta_{38-43}$ aminoácidos de comprimento, no qual níveis elevados de $A\beta$ no cérebro, levaria à agregação de $A\beta$ (CHEIGNON, C. et al, 2018), consistindo na formação de espécies de oligômeros que são reorganizadas em protofibrilas e fibrilas, encontradas em placas amilóides (PHAM et al, 2010).

Sugere-se que os oligômeros acumulados no cérebro de pacientes com DA, causam danos a membrana celular, iniciam eventos como a formação intracelular de emaranhados neurofibrilares e a interrupção das funções sinápticas levando à disfunção celular e morte do neurônio e deficiência cognitiva resultante (GLABE et al, 2006).

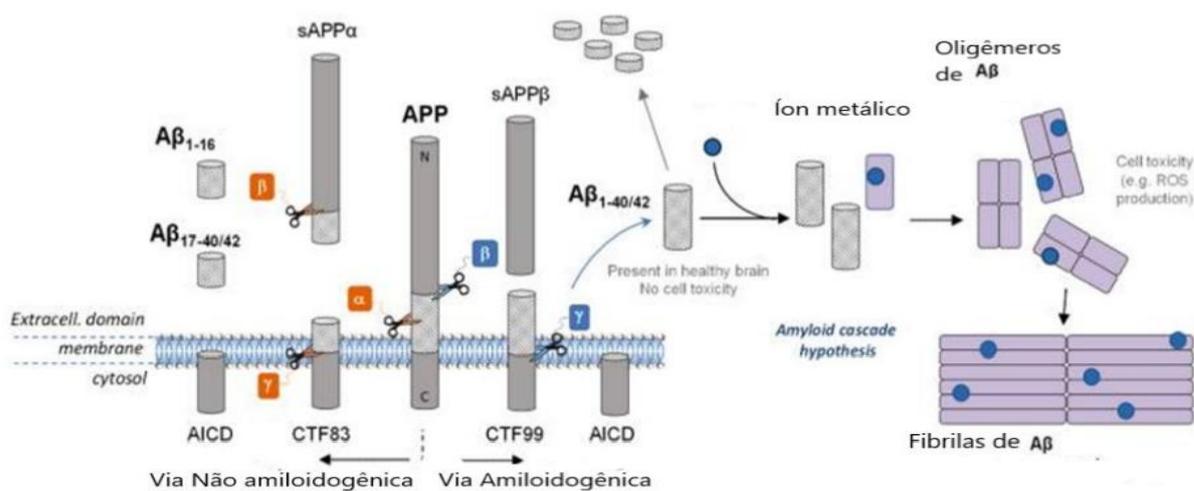


Figura 5: Processamento da APP pelas vias não amiloidogênicas e amiloidogênicas – Adaptado de (CHEIGNON, C. et al, 2018).

Na via de processamento não amiloidogênica, a APP é primeiro processada pela enzima α -secretase, dentro do domínio β -amilóide ($A\beta$) (VILATELA; LÓPEZ-LÓPEZ; YESCAS-GÓMEZ, 2012), gerando um fragmento solúvel $sAPP\alpha$ e o fragmento α -CTF que possui 83 aminoácidos de comprimento e fica ancorado na porção transmembranar (TAN; GLEESON, 2019). Posteriormente, ocorre a clivagem de α -CTF pela enzima γ -secretase, que libera os fragmentos p3 e AICD (TAN; GLEESON, 2019).

Já na via amiloidogênica, a enzima β -Secretase, (BACE1), cliva a APP no limiar do domínio β -amilóide (VILATELA; LÓPEZ-LÓPEZ; YESCAS-GÓMEZ, 2012), gerando um fragmento sAPP β e β -CTF, com 99 aminoácidos de comprimento, onde o β -CTF sofre a ação de γ -secretase, gerando os fragmentos amilóides A β (A β 40 ou A β 42) e AICD (TAN; GLEESON, 2019; THOMAS; FENECH, 2007; VILATELA; LÓPEZ-LÓPEZ; YESCAS-GÓMEZ, 2012).

A clivagem da γ -secretase é promíscua e vários outros substratos não-APP, são clivados por este complexo, assim como a clivagem por γ -secretase na APP ocorre em vários locais para gerar péptido A β de comprimento diferente (SELKOE; KOPAN, 2003). Os genes *PSEN1* e *PSEN2* (Presenilinas 1 e 2) codificam subunidades catalíticas de γ -secretase (THOMAS; FENECH, 2007). Mutações dentro de *PSEN1* aumentam a produção do A β 42, e mutações em *PSEN2*, associam-se a forma precoce da doença, podendo haver incidência, entre 40 a 80 anos de idade (HARDY, 2001).

O A β 42 faz com que os neurônios sofram apoptose pela sensibilização de suas membranas após a peroxidação lipídica (THOMAS; FENECH, 2007). Na DA, agregados tóxicos de β -amilóide (A β 42) e pTau hiperfosforilada, podem interagir com organelas subcelulares dos neurônios, desencadeando disfunção neuronal e apoptose levando ao declínio da memória e à demência (KUMAR; SINGH; EKAVALI, 2015). Outros sinais de apoptose em cérebros de Alzheimer incluem fragmentação de DNA elevada e ativação de caspase induzida por A β 42, fortes indutoras de apoptose (THOMAS; FENECH, 2007).

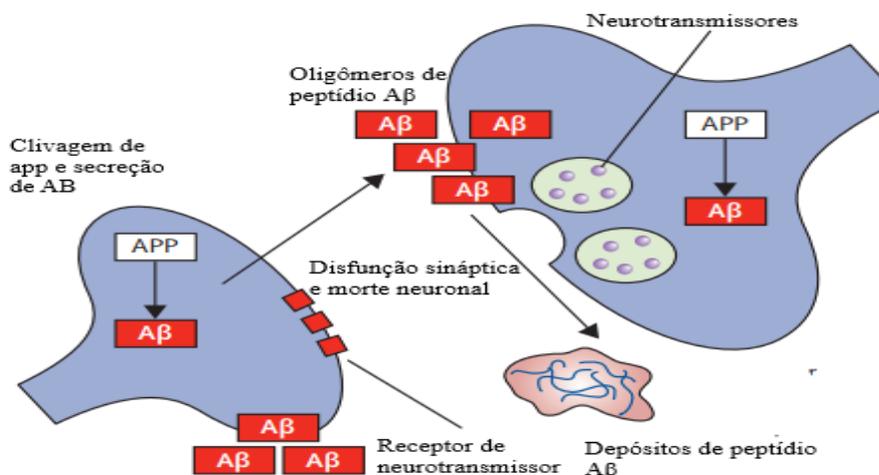


Figura 6. Efeitos da clivagem de app em peptídeo b-amiloide com capacidade de formação de oligômeros e autoagregação em placas extracelulares, levando a disfunção sináptica e morte neuronal. Adaptado de (BALLARD et al, 2011).

Estes achados sustentam que oligômeros de $A\beta_{42}$ associam-se a hiperfosforilação da pTau, resultando em neurite distrófica. Foi percebido, que a pTau hiperfosforilada, não induz a patologia amiloide, mas está diretamente associada à progressão do declínio cognitivo (TAN; GLEESON, 2019; CHEIGNON, C. et al, 2018).

2.5. Proteína TAU

A Tau é uma proteína associada a microtúbulos encontrada principalmente em neurônios do sistema nervoso central (SNC), embora também seja expressa em baixos níveis em astrócitos e oligodendrócitos (SHIN et al, 1991). É altamente solúvel e encontrada desdobrada no citoplasma em células normais, onde desempenha um papel importante na automontagem, estabilização e função dos microtúbulos (ARENDDT et al, 2016). Devido a sua função de regulação e estabilizaçãodo citoesqueleto, a Tau está envolvida em funções como sinalização celular, plasticidade sináptica e regulação da estabilidade genômica (ARENDDT et al, 2016; MANDELKOW e MANDELKOW, 2012).

A proteína Tau, é expressa principalmente em neurônios, sendo crucial na estabilização do citoesqueleto neuronal (MARTIN et al., 2013). Tau, por meio da ligação com os dímeros de tubulina, formam o citoesqueleto (JOUANNE; RAULT; VOISIN-CHIRET, 2017). A fosforilação da proteína Tau, é necessária para o tráfego

intracelular, permitindo o transporte, seguindo com a desfosforilação, retornando a proteína Tau ao microtúbulo (O'BRIEN; WONG, 2011).

Os Emaranhados Neurofibrilares (ENF) (*neurofibrillary tangles*, sigla em ingles), são inclusões filamentosas de proteína Tau aberrantemente dobradas e hiperfosforiladas, que tendem a se agregar emparelhadamente no interior dos neurônios, ocasionando danos a estrutura neuronal e conseqüentemente a morte destas células, resultando em deficits cognitivos no paciente afetado (KINNEY et al., 2018; SERRANO POZO ET AL, 2011).

A enzima fosforilase GSK3 β , regula os eventos de fosforilação de Tau e sua atividade na estabilização dos microtúbulos. Quando sua atividade é excessiva, as proteínas Tau dissociam-se dos microtubulos, e tendem a agregar-se lateralmente formando emaranhados intracelulares, implicando em aumento na produção de peptídeo A β , indução de apoptose e redução da neurogênese e da plasticidade sináptica (WANG et al., 2008).

A proteína Tau é codificada pelo gene *MAPT0*, que se localiza no cromossomo 17q21, compreendendo 15 exons, com 11 destes, codificando para todas as principais isoformas da Tau (THOMAS; FENECH, 2007). Em humanos, 6 isoformas principais são geradas por splicing alternativo dos éxons 2, 3 e 10 originando proteínas Tau com 3 ou 4 domínios de ligação ao microtúbulo, 3R e 4R, respectivamente (BALI et al, 2010). Essas duas formas são encontradas em quantidades iguais em indivíduos saudáveis, com pequenas variações na expressão, em algumas poucas regiões do cérebro (LOVE; HAYDEN; ROHN, 2015). Porém, a expressão relativa da isoforma 4R foi associada a níveis aumentados de emaranhados neurofibrilares e agregação de Tau (LOVE; HAYDEN; ROHN, 2015), de encontro a progressão da deficiência cognitiva na DA e outras taopatias.

A proteína Tau pode sofrer várias modificações pós-traducionais, como fosforilação, acetilação, nitração, glicação, glicosilação, ubiquitinação e truncamento, as quais podem alterar sua função e localização celular (MARTIN et al., 2013; HOLTZMAN, et al. 2016).

Várias espécies de Tau, como formas solúveis, dobradas, hiperfosforiladas e mal localizadas, estão sendo descritas como tóxicas atualmente. A hiperfosforilação da Tau diminui sua afinidade pelos microtúbulos, o que por sua vez leva à desestabilização e desmontagem do citoesqueleto (HOSKIN ET AL, 2019).

Essas moléculas de Tau destacadas têm uma afinidade uma pela outra e podem se auto-agregar para formar oligômeros de Tau mal dobrada (ARENDRT et al, 2016). Os oligômeros ganham mais unidades e evoluem para depósitos de Tau, que por sua vez se fundem e se agregam como emaranhados neurofibrilares (ARENDRT et al, 2016; HOSKIN ET AL, 2019).

Essas formas não fisiológicas de Tau podem levar a uma cascata de eventos patológicos inter-relacionados, incluindo transporte axonal prejudicado, alteração da estrutura e função sináptica, disfunção mitocondrial, alteração no transporte de vesículas, ativação de uma resposta imune e degradação ineficaz da proteína (ARENDRT et al, 2016; HOSKIN et al, 2019).

A fosforilação da Tau é regulada pelo equilíbrio das atividades da Tau quinase e da fosfatase, onde o desequilíbrio destas sugere a origem da fosforilação anormal da Tau (MARTIN et al., 2013).

Foi percebido que a indução $A\beta$ sintético no cérebro de camundongos selvagens, levou a degeneração de neurônios e extensa morte celular, entretanto o mesmo não foi observado em neurônios murinos originados de camundongos Tau *knockout* (BLOOM., 2014). Segundo a hipótese amiloide, as concentrações tóxicas de $A\beta_{42}$ induzem a formação dos emaranhados neurofibrilares de proteína Tau (BALLARD et al., 2011; KINNEY et al., 2018).

2.6 Neuroinflamação na Doença de Alzheimer

Estudos indicam que a neuroinflamação desempenha um papel na progressão da DA (KINNEY et al., 2018). A inflamação aguda no cérebro é uma defesa contra infecções, toxinas e lesões, mas, desequilíbrios na sinalização imune, podem

ocasionar uma neuroinflamação crônica (FERREIRA et al., 2014; KINNEY et al., 2018; LICASTRO; PORCELLINI, 2016).

Na década de 1990, grandes estudos epidemiológicos e observacionais foram publicados, indicando que drogas anti-inflamatórias não-esteróides (AINE) utilizadas no tratamento de doenças como artrite reumatoide, reduziram 50% o risco de desenvolvimento de DA, em pacientes que são usuários de longo prazo AINE (KINNEY et al., 2018).

Tal neuroinflamação pode ser atribuída a ativação de micróglias com consequente liberação de citocinas de ação pró e anti-inflamatórias (KINNEY et al., 2018). A inflamação no cérebro, possui um papel neuroprotetor, mas também é sabido que após a resposta aguda, há a montagem de uma resposta inflamatória crônica, que é danosa ao ambiente cerebral (KINNEY et al., 2018).

Micróglias, são células derivadas de macrófagos embrionários, residentes no cérebro sendo a principal célula imunocompetente e provavelmente a coordenadora de respostas inflamatórias no sistema nervoso central (SNC) (ULLAND; COLONNA, 2018). A morfologia da micróglia contempla um espectro de células com morfologia ameboide, com pequeno corpo celular arredondado e altamente ramificado no micro ambiente onde se encontram, ou podem apresentar morfologia ameboide com pouca ou nenhuma ramificação, assemelhando-se morfologicamente a um macrófago periférico (FRANCO-BOCANEGRA et al., 2019).

Em um ambiente cerebral saudável, as micróglias encontram-se inativadas e morfologicamente apresentam pequenas ramificações na membrana, chamadas de Somas ou processos (GLENN et al., 1992; KINNEY et al., 2018). Estes Somas atuam no patrulhamento do ambiente cerebral, através de movimentos ameboides, mas sem grande motilidade celular (BILBO; SCHWARZ, 2012; KINNEY et al., 2018; MRAK, 2012).

Tais células imune correspondem de 0,5 a 16% das células cerebrais (FRANCO-BOCANEGRA et al., 2019), e moldam a arquitetura sináptica, sendo essenciais para o estabelecimento e amadurecimento de redes neurais (BILBO; SCHWARZ, 2012). As micróglias têm em comum com os macrófagos periféricos a

expressão de várias proteínas especializadas no reconhecimento de “sinais de alarme”, contra patógenos e agentes tóxicos (BILBO; SCHWARZ, 2012; FRANCO-BOCANEGRA et al., 2019; KINNEY et al., 2018).

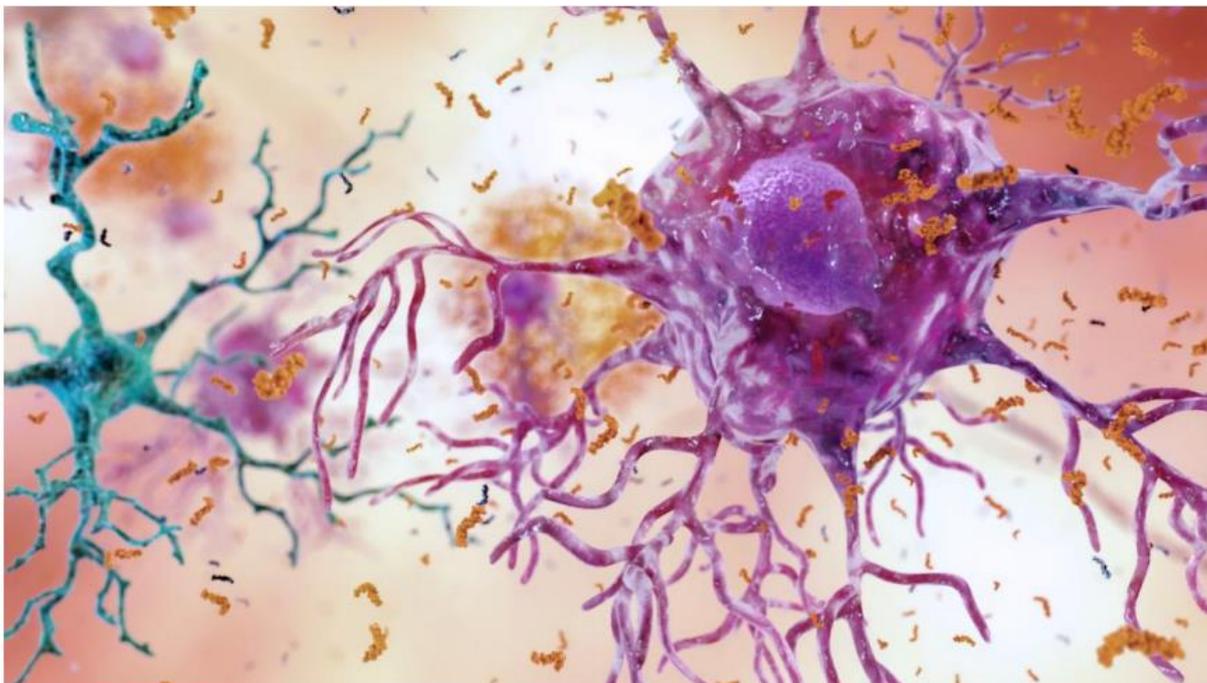


Figura 7. Representação de micróglia patrulhando o ambiente cerebral e atuando na depuração do peptídeo A β excessivo. Adaptado de National Institute of Aging- (www.nia.nih.gov/alzheimers/scientific-images)

Evidências de estudos em camundongos sugerem participação microglial na plasticidade sináptica, poda de espinhos dendríticos e terminais de axônios pré-sinápticos(FRANCO-BOCANEGRA et al., 2019).

As micróglia ativadas cronicamente secretam mediadores pró-inflamatórios e tóxicos, incluindo espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico e citocinas (KINNEY et al., 2018). Foi observado que a expressão da citocina IL-1 β estimula a produção IL-6, levando a ativação de CDK5, cinase conhecida por hiperfosforilar a proteína Tau (KINNEY et al., 2018; QUINTANILLA et al., 2004).

A interleucina-1 é um mediador pró-inflamatório. Monócitos ativados exibem receptores de IL-1 e o receptor de eliminação de macrófagos (MSRI), relacionado a fagocitose do peptídeo β -amilóide (SPITZER et al, 2019).Estudos de meta-análise, indicaram aumento significativo de IL-1 plasmático em pacientes com DA, mas, devido a variações individuais, não é indicado o seu uso como um marcador da doença,

sendo sugerida a identificação de receptores de superfície de células imunológicas (SWARDFAGER et al, 2010).

O MSRI é um receptor envolvido na fagocitose das placas amiloides, estando menos expresso em monócitos com perfil pró inflamatório (EL KHOURY et al, 1996). Spitzer (2019), encontrou níveis elevados de 1l-1B e IL-1RI, menor expressão de MSRI e aumento nos níveis de IL-1Ra, indicando a ativação de monócitos pró inflamatórios e uma contra regulação da inflamação.

Tal persistência do processo inflamatório no cérebro é bem atribuída à perda neuronal que ocorre com a patologia amilóide. A inflamação crônica é atribuída a ativação microglial além da expressão de inúmeras citocinas no cérebro (KINNEY et al., 2018).

Na DA, existe a hipótese de que o peptídeo A β induz a ativação da micróglia, que responderia, migrando para os sítios das placas senis, na tentativa de fagocitar as placas amiloides, como representado na figura 7, acima (KINNEY et al., 2018).

A ativação prolongada da micróglia exerce um efeito positivo na depuração deste peptídeo, mas com a constante ativação, logo a micróglia já não consegue fagocitar este peptídeo adequadamente, e com a presença constante de A β , provoca uma microgliose reativa, exarcebando a patologia da DA (KINNEY et al., 2018; LICASTRO; PORCELLINI, 2016).

A ativação persistente da micróglia implica na produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), Óxido Nítrico (NO) e citocinas. Processos crânio-traumáticos podem levar a indução deste fenômeno (KINNEY et al., 2018; LICASTRO; PORCELLINI, 2016).

A ativação das células micróglia pode levar ao recrutamento de astrócitos, que aumentam a resposta inflamatória aos depósitos de A β extracelulares. Este componente neuroinflamatório da DA é adicionalmente caracterizado por uma fase de resposta aguda local mediada por citocinas, ativação da cascata complemento e indução de um sistema enzimático inflamatório, como NO sintase induzida (iNOS),

além da geração de cicloxigenase-2 (COX-2) (KINNEY et al, 2018; VIEGAS, et al, 2011).

Os astrócitos, por sua vez, participam da degradação e remoção do A β , servindo de barreira protetora entre os depósitos de A β e os neurônios. E devido a este caráter multifactorial da resposta inflamatória e pela ocorrência de uma grande diversidade de mediadores pró- e antiinflamatórios relacionados ao retardo ou a progressão da inflamação (KINNEY et al, 2018; VIEGAS, et al, 2011).

2.7. Biomarcadores e diagnóstico da DA

Segundo o Instituto Nacional do Envelhecimento e Associação de Alzheimer (NIA-AA) em suas diretrizes mais recentes, rege que a demência não é uma “doença”, mas sim uma síndrome composta de sinais e sintomas que podem ser causados por várias outras desordens traumáticas ou metabólicas, originando um conjunto de sintomas amnésicos, apresentando-se em desacordo quanto a sua etiologia (JR et al, 2018).

Alguns pacientes mostram diferenças em relação as apresentações clínicas (patologia Amiloide e patologia Tau), exibindo níveis considerados normais, assim como quadros assintomáticos relacionados a patologia amiloide e Tau, confirmadas na autópsia (FROTA, 2011).

Assim, o fenótipo de demência amnésica de múltiplos domínios não é específico, podendo ser gerado por outras doenças, assim como distúrbios de linguagem, viso espaciais e executivas (JACK JR et al, 2018). Além disso, há uma porcentagem significativa de idosos cognitivamente saudáveis, apresentando biomarcadores amilóides anormais e alterações neuropatológicas da DA (JACK JR et al, 2018).

Os sintomas amnésicos compõem a forma mais comum de apresentação da DA, ocorrendo deficits relacionados a memória episódica, onde a capacidade consciente de recordar eventos no tempo e espaço, se vêem prejudicadas (ALBERT et al., 2011). Em sequência, a capacidade de memória semântica, aquela que significa símbolos, palavras e memórias de longo prazo, é alterada, paralelamente a

progressão da doença (CARAMELLI et al., 2011), manifestando-se como esquecimento de fatos corriqueiros como lembrar onde pôs as chaves, ou dificuldades de aprendizagem de novos fatos ou conteúdos, ou interpretações semânticodiscursivas (interpretação de mensagens, analogias, metáforas) prejudicadas (BAYLES et al., 1992).

O NIA-AA, estabeleceu diretrizes para o diagnóstico de DA, estabelecendo estágios de progressão da DAE e o uso de biomarcadores para fins diagnósticos (MCKANN et al., 2011).

No primeiro estágio, ou fase “pré-clínica da DA”, são percebidas alterações na cognição e atividades cotidianas, sendo percebido um pior desempenho em testes cognitivos, com aumento na detecção de biomarcadores como líquido cefalorraquidiano (LCR) e/ou PET amiloide e Tau (CARLETTICASSANI, 2019). No segundo estágio, também chamado de Comprometimento Cognitivo Leve (CCL) ocorrem alterações na memória e cognição, mas sem prejuízos grandes nas funções diárias, diferindo do terceiro estágio, onde uma ou mais funções cognitivas são prejudicadas, impedindo a execução de atividades diárias e autonomia do sujeito afetado (CARLETTI; CASSANI, 2019; MCKANN et al., 2011).

O comitê da NIA-AA concordou que apenas biomarcadores específicos para as proteinopatias da DA (isto é, A β e Tau patológica) devem ser consideradas como definições potenciais da doença, devido a patologia amilóide se relacionar diretamente com o aparecimento da patologia TAU, sendo necessária a presença destes dois biomarcadores, para a rotulação do termo Doença de Alzheimer (JACK JR et al, 2018).

As diretrizes de diagnóstico NIA-AA de 2011, recomendam um quadro diagnóstico in vivo, através do sistema de classificação [AT (N)] (JACK JR et al, 2018). Tal sistema agrupa diferentes biomarcadores referentes a processos patológicos da DA, onde um biomarcador pode medir: A β (A), Tau patológica (T) e neurodegeneração/lesão neuronal (N), apresentando a DA, como um continuum, a ser confirmado como DA, pelo suporte de tais marcadores (JACK JR et al, 2018).

Para uma definição mais precisa, houve um refinamento do Sistema A T (N) na última atualização, criando-se um Sistema de classificação que contempla 8 “perfis” de

biomarcadores, onde cada indivíduo pode ser colocado em uma das três “categorias” gerais com base em perfis de biomarcadores.

Na tabela 1, podem ser observados os perfis gerados e as possíveis classificações (JACK JR et al, 2018).

Tabela 2: Perfis gerados pelo Sistema de classificação A + T + (N), agrupando perfis como não portadores de Alzheimer, indivíduos no continuum de Alzheimer (possíveis portadores) e Portadores de Alzheimer. (Adaptado de JACK JR et al, 2018).

<i>Perfis de AT (N)</i>	<i>Categoria de biomarcador</i>	
<i>A- T- (N) -</i>	Biomarcadores em taxas normais (paciente não Alzheimer)	
<i>A + T- (N) -</i>	Mudança Patológica de Alzheimer	Continuum de alzheimer
<i>A + T+ (N></i>	Doença de Alzheimer	
<i>A + T+ (N)+</i>	Doença de Alzheimer	
<i>A + T- (N)+</i>	Doença de Alzheimer e concomitante suspeita de alteração patológica não Alzheimer	
<i>A-T + (N) -</i>	Alteração patológica não relacionada à DA	
<i>AT- (N) +</i>	Alteração patológica não relacionada à DA	
<i>A-T + (N) +</i>	Alteração patológica não relacionada à DA	

Os marcadores indicados para preencher os fatores A-T + (N) + são a Tomografia por emissão de Pósitrons (PET- *Positron emission tomography*) mais a determinação da razão do Peptídeo $A\beta_{40-42}$ no líquido cefalorraquidiano (LCR), medidas de PET para a proteína Tau e determinação de proteína Tau hiperfosforilada, e marcadores de neurodegeneração ou lesão neuronal, que são obtidos através das taxas de metabolismo do hipocampo e imagens de atrofia cortical por ressonância magnética (RM) (EWERS et al., 2007;. JACK JR et al, 2018).

Os biomarcadores do LCR, mensuram as concentrações de proteínas no LCR do saco lombar que refletem as taxas de produção (expressão proteica ou liberação/secreção de neurônios ou outras células cerebrais) e depuração (degradação ou remoção) em um dado momento (GORDON et al, 2016). As medidas de imagem, por outro lado, representam a magnitude da carga ou dano neuropatológico acumulado ao longo do tempo (GORDON et al, 2016).

Baixas concentrações de peptídeo amiloide no CSF, é considerado como um biomarcador de estado patológico associado a formação das placas amiloides, enquanto um PET amiloide, revela o nível de deposição de placas amiloides, onde os níveis da proteína Tau hiperfosforilada espelha a presença de filamentos pareados helicoidais e o PET Tau, mensura os depósitos de Tau no tecido (JACK JR et al, 2018)

Como a doença se manifesta tardiamente após um longo período de neurodegeneração clinicamente silenciosa, o conhecimento dos fatores de risco modificáveis e a implementação de biomarcadores é crucial na prevenção primária e na detecção pré-sintomática da DA, respectivamente (HICKMAN; FAUSTIN; WISNIEWSKI, 2016).

Uma alternativa a processos invasivos e estressantes ao paciente, como a punção lombar, são os biomarcadores sanguíneos, uma vez que são menos invasivos e mais baratos (LISTA et al., 2015). Os biomarcadores genéticos, quantificados por meio ou à partir da análise de amostras biológicas, fornece informações genéticas do perfil de cada indivíduo, auxiliando na obtenção dos perfis genotípicos que contenham alelos associados ao risco de DA.

Através de grandes metanálises e de estudos de associação genômica ampla (GWAS), foi possível identificar, variantes comuns associadas ao risco de Alzheimer, através de estudos caso controle (GROZEVA, 2019).

2.8. Fatores genéticos associados

O estabelecimento da DA deve-se ao acúmulo de eventos genéticos e ambientais. Cada um desses eventos contribui com pequenos efeitos que resultam, em conjunto, no estabelecimento da doença de acordo com a gravidade (FRIDMAN et al

A DA de início precoce foi associada, até o momento, a mutações em genes que codificam para a proteína precursora da β -amilóide (*APP*: β -amyloid precursor protein-21q21.3), presenilina 1 (*PSEN1*: *presenilin1*-4q24.3) e presenilina 2 (*PSEN2*: *presenilin 2* - 1q31-q42) (OJOPI; BERTONCINI; DIAS NETO, 2004; TAN; GLEESON,

2019). Os sintomas EOAD se desenvolvem muito mais cedo do que em DAE, (LOAD) e geralmente ocorrem antes dos 65 anos de idade, podendo iniciar o aparecimento dos sintomas aos 30 anos, em alguns casos (TAN; GLEESON, 2019).

Estudos com indivíduos com síndrome de Down (trissomia do cromossomo 21) levaram a observação de sinais precoces de demência, semelhante a DA (TAN; GLEESON, 2019). Devido a trissomia do 21 e apresentação de sintomas demenciais nestes indivíduos, levou a identificação do gene *APP* no cromossomo 21 e este fato esta de acordo com indivíduos que possuem deleção do segmento que contém *APP*, estarem associados a um efeito protetor da doença (SUZUKI et al, 1994; TAN; GLEESON, 2019).

Mutações sem sentido dentro do gene *PSEN1* são responsáveis por 18% a 50% das formas autossômicas dominantes de início precoce da DA (THEUNS et al, 2000). Essas mutações estão associadas a uma patologia mais agressiva, aparecendo entre 30 e 50 anos, nao sendo influenciada pelo Status *APOE* (WRAGG et al, 1996)

O gene da *APOE* está localizado no cromossomo 19q13.2 e certos polimorfismos estão associados à forma tardia da DA (> 65 anos- LOAD) (ROSES, 1997). O alelo *E3* é considerado normal e ocorre em ~74% da população; os alelos *E2* e *E4* são menos comuns, ocorrendo em 10 e 16% da população, respectivamente (CORDER, et al, 1993)

Enquanto o alelo *APOE* ϵ 4, aumenta o risco de desenvolver DAE, os alelos *APOE* ϵ 3 e *APOE* ϵ 2, associam-se a redução do risco de desenvolver DA e ao retardo do início dos sintomas, menor declínio cognitivo relacionado a idade e menor atrofia cortical, além de haver agregação mais lenta de $A\beta$ e maior eficiencia na depuração deste peptídeo, respectivamente (STIPHO et al.,2018). Porém, percebeu-se, que ainda que em menor chance, portadores homozigotos do alelo *APOE* ϵ 2, ainda são suscetíveis ao desenvolvimento de DA, apresentando fenótipo clínico não amnésico mais leve, porém, associam-se a maiores taxas de doença de pequenos vasos (GROOT et al., 2018).

O gene *APOE* não causa a doença de Alzheimer, mas age como um marcador que altera o risco individual baseado na posse de combinações alélicas do gene *APOE*, onde a maior combinação de risco se dá com o genótipo *E4/E4* (CORDER et al, 1993). Cada cópia do alelo *APOE4* reduz de 85 anos, idade média para início em um indivíduo não-*E4*, para, 75 anos para um alelo e 68 anos para indivíduos com duas cópias do alelo *E4* (CORDER et al, 1993).

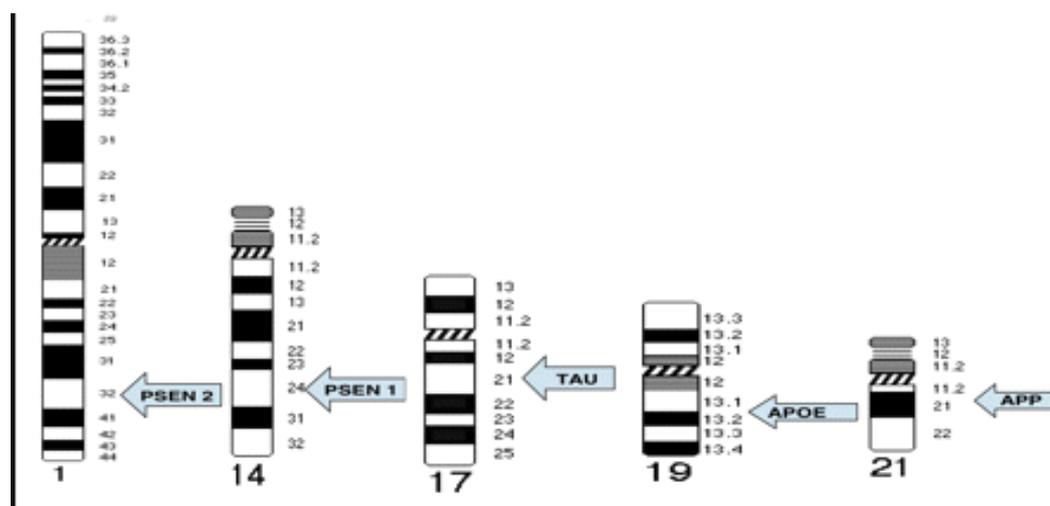


Figura 8. Cromossomos e as respectivas posições dos principais genes relacionados ao Alzheimer (Adaptado de THOMAS; FENECK, 2007).

Na DAE, o espectro de mutações é distinto e a herdabilidade é menos significativa que na EOAD, sendo constituída por um complexo de genes e estilo de vida (GROZEVA, 2019). Embora já tenham sido relatados na literatura mais de 30 possíveis marcadores genéticos para a DA de início tardio, até o momento, alelo $\epsilon 4$ do gene *APOE*, foi implicado ao aumento de risco (OJOPI; BERTONCINI; DIAS NETO, 2004).

Foi percebido, que uma proporção de DA é explicada pela variação rara com tamanhos de efeito maiores do que os normalmente vistos com variação comum (GROZEVA, 2019).

A mudança de Arginina para histidina na posição 47 (R47H) dentro do receptor desencadeante expresso em células mieloides 2 (*TREM2*), foi apontada como uma variante de risco para LOAD, e embora os tamanhos de efeito-risco variem por coorte, os resultados sugerem que o *TREM2* R47H é o principal fator genético para DA esporádica, após o *APOE* $\epsilon 4$ (GROZEVA, 2019).

As variantes de susceptibilidade identificadas são encontradas em regiões intergênicas ou intrônicas (portanto denominado locus invés de gene), tornando difícil identificar qual variante tem um efeito funcional (GROZEVA, 2019). Recentemente, outros loci significativos, foram associados a LOAD, através da análise GWAS, de amostras de grandes consórcios mundiais de pesquisa em DA, identificando *TRIP4*, *ECHDC3*, *IQCK*, *ACE*, *ADAM10* e *ADAMTS1* como locus de susceptibilidade (KUNKLE et al, 2019).

Ainda assim, esses estudos GWAS carecem de ser confirmados em populações distintas, uma vez que cada etnia e indivíduo apresentam distintos perfis de variação genética.

2.8.1 Gene CASS4

A patologia da DA é fortemente associada com o gene *CASS4* pelo IGAP (Projeto Internacional de Genômica da Doença de Alzheimer), sendo confirmado por estudos seguintes (SESHADRI et al, 2010; HOLLINGWORTH et al, 2011; LAMBERT et al; HAROLD et al, 2009; KUNKLE et al., 2019).

Sugestão: O Projeto Internacional de Genômica da Doença de Alzheimer (IGAP) demonstrou a patologia da DA é fortemente associada com o gene *CASS4*. Esse resultado foi confirmado em outros estudos (SESHADRI et al, 2010; HOLLINGWORTH et al, 2011; LAMBERT et al; HAROLD et al, 2009; KUNKLE et al., 2019).

O gene *CASS4* está localizado no cromossomo 20q13.31 e codifica uma proteína Scaffold, com múltiplos domínios que interagem com proteínas diversas, participando de redes de sinalização, principalmente relacionadas a reorganização do citoesqueleto, formação de adesões focais e alterações na morfologia e motilidade celular (HASSAN ET AL., 2018).

CASS4 (*Crk Associated protein member 4*) é o quarto e último membro descrito da família de proteínas CAS, que inclui NEDD9- HEF1 ou CASL, P130 ou BCAR1, EFS ou SIN, onde o *CASS4*

foi identificado por Singh et al. em 2008, através da análise de sequências e RNAm em organismos evolutivamente diversos, utilizando sequências homólogas de outros membros da família, para tal categorização.

Nos seres humanos são conhecidas quatro variantes de transcrição (BECK et al., 2014). O primeiro e o segundo contêm 7 éxons e codificam a mesma isoforma proteica a de comprimento total (786 aminoácidos, considerada a isoforma principal), o terceiro contém 6 éxons e codifica uma isoforma b mais curta (732 aminoácidos) e o quarto contém 5 éxons e codifica a isoforma c mais curta (349 aminoácidos) (BECK et al., 2014; SINGH et al., 2008).

O CASS4, compreende uma proteína relacionada à sinalização mediada por integrinas e alterações conformacionais no citoesqueleto, implicando em relação com adesões focais, motilidade, migração, espalhamento, desprendimento, diferenciação e controle do ciclo celular, além da sinalização e resposta a fatores de crescimento e resposta a patógenos (BECK et al., 2014; SINGH et al., 2008).

Devido ao alto grau de homologia nos domínios de interação entre os parceiros comuns identificados, o CASS4 provavelmente compartilha algumas funções com outros membros da família CAS, incluindo as funções relacionadas a sinalização iniciada por integrinas, resultando na reorganização do citoesqueleto (HSIA et al., 2003).

Singh et al. 2008, mostraram a interação direta entre CASS4 e FAK (Homólogo de PTK2B) observando a regulação e ativação de FAK por CASS4, afetando a adesão celular, migração e motilidade. A super expressão de CASS4 e os outros membros da família, foi associada ao aumento da divisão celular em células de linhagem de cancer (BECK et al., 2014).

O CASS4 está relacionado a formação de placas neuríticas e emaranhados neurofibrilares e conseqüentemente na disfunção sináptica na DAE, além disso, está envolvido em processos inflamatórios, sinalização de cálcio e estabilização de microtúbulos, sugerindo associação entre CASS4 e a patogênese da DA (BECK et al., 2014).

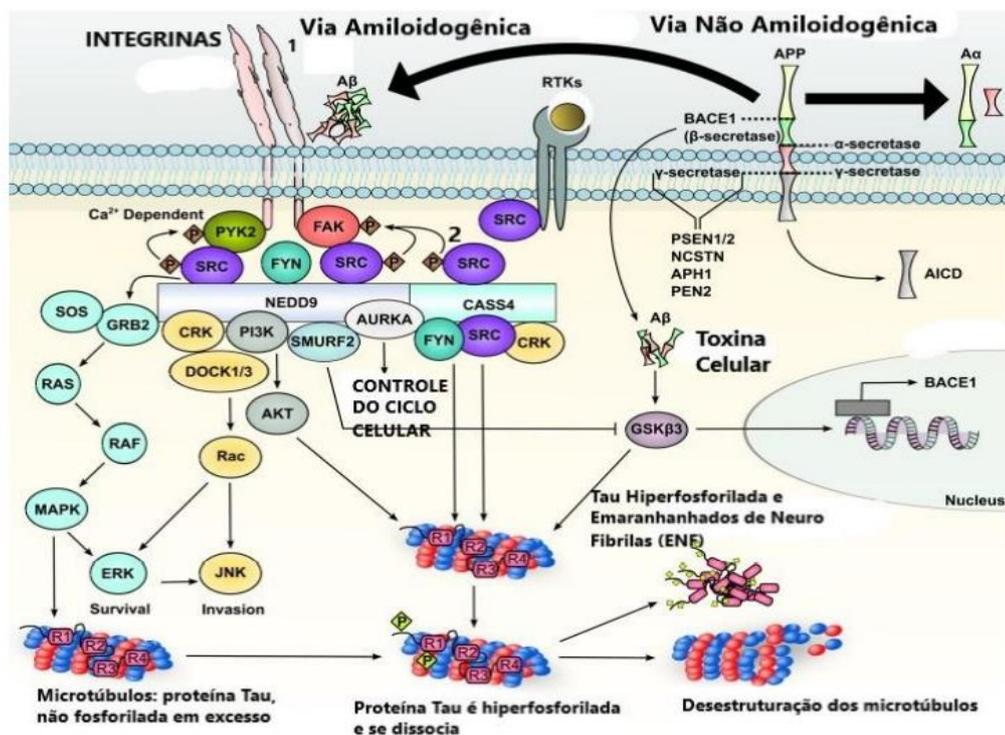


Figura 10: Rede de sinalização gerada por ativação de integrinas pelo peptídeo A β (Adaptado de (BECK et al., 2014))

Polimorfismos em CASS4 estão associados a diminuição de risco de desenvolvimento de DAE e a redução de placas neuríticas, enquanto outros SNP, associam-se ao risco de desenvolvimento de DAE (HOLLINGWORTH et al, 2011; LAMBERT et al; HAROLD et al, 2009; KUNKLE et al., 2019).

O polimorfismo rs 911159 (variação de G/C) foi associado ao aumento do declínio cognitivo em uma população asiática (LIN et al., 2017). Tais polimorfismos, carecem de ser confirmados em populações distintas, a fim de se avaliar o seu potencial uso como biomarcador preditivo para DAE.

2.9. Tratamento

Infelizmente, ainda não há cura para DA. O tratamento consiste em tratar os sintomas cognitivos e comportamentais, como forma de diminuir a progressão da doença. O tratamento consiste em aumentar os níveis de acetilcolina, hormônio neurotransmissor presente nas regiões cerebrais da memória, onde sua redução está correlacionada com o déficit cognitivo (SERENIKI; VITAL, 2008; KIHARA et AL., 2004)

O tratamento consiste na administração de inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE) como a tacrina, rivastigmina, donepezil, galantamina, como forma de diminuir a degradação da acetilcolina, aumentando seu potencial de estimular receptores nicotínicos e muscarínicos, onde a resposta foi de uma eficácia de 30 a 40% de melhora, em pacientes com DA leve a Moderada (SERENIKI; VITAL, 2008;GROSSBERG, 2003).

A rivastigmina (Exelon®), foi capaz de inibir tanto a enzima acetilcolinesterase quanto a butirilcolinesterase, aumentando os níveis cerebrais de acetilcolina, mas, com elevação da dose, podem ocorrer efeitos colinérgicos adversos, efeitos gastrointestinais e o aumento de ganho de peso (SERENIKI; VITAL, 2008). A tacrina (Cognex®) foi o primeiro inibidor reversível da acetilcolinesterase a ser utilizado no tratamento da DA, porém, pode resultar em hepatite medicamentosa, com necessidade de suspensão do medicamento. (SERENIKI; VITAL, 2008)

A galantamina (Reminyl®) também é um anticolinesterásico de dupla ação, utilizado no tratamento da DA. Além de inibir a acetilcolinesterase, também é capaz de modular os receptores nicotínicos pré sinápticos, que estão associados a liberação de neurotransmissores importantes para função cognitiva, onde a ligação da galantamina com os subtipos de receptores nicotínicos melhorou a função cognitiva e a memória em pacientes afetados por DA (ANAND et al., 2014;SERENIKI; VITAL, 2008;)

Também são utilizados no tratamento dos sintomas cognitivos, antagonista dos recetores N-metil D-Aspartato (NMDA) (memantina), medicamento que possui efeitos sobre a neurotransmissão glutamatérgica, visto que o glutamato é um neurotransmissor associado, a funções cognitivas e memória (ANAND et al., 2014). Além do fato, que problemas na regulação deste neurotransmissor, como alterações nos níveis e exposição prolongadas ao glutamato, podem induzir morte aos neurônios. Desta forma, o tratamento combinado de Memantina e inibidores das colinesterases em pacientes com DA é seguro, bem tolerado e pode favorecer a melhora dos sintomas cognitivos (GROSSBERG, 2003; ANAND et al.,2014).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo analisar a associação entre o polimorfismo rs911159 do gene *CASS4* com a Doença de Alzheimer em pacientes de Vitória, ES/Brasil.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Caracterizar a amostra de pacientes com Doença de Alzheimer Esporádica e controles não demenciados;
- Estimar a frequência genotípica e alélica do polimorfismo rs911159 do gene *CASS4* em pacientes com diagnóstico provável de Doença de Alzheimer e controles;
- Verificar a associação do polimorfismo rs911159 do gene *CASS4* com Doença de Alzheimer em pacientes de Vitória-ES;

4. METODOLOGIA

Trata-se de um estudo transversal, observacional e analítico de associação caso: controle, realizado em uma amostra da população da Grande Vitória do estado do Espírito Santo, Brasil.

4.1. AMOSTRA

Este estudo foi realizado em uma amostra de 143 indivíduos não consanguíneos residentes da Grande Vitória, ES atendidos no Hospital Santa Casa de Misericórdia de Vitória (HSCMV) ou Centro de Referência de Atendimento ao Idoso (CRAI). A amostra deste trabalho contou com 78 pacientes com diagnóstico provável de Doença de Alzheimer (DA) e 69 controles sem a doença. Todos os participantes foram avaliados pelo médico geriatra Dr. Renato Lírio Morelato. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos da UFES. Os participantes do estudo ou representantes legais assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido para participar do estudo.

Os pacientes desta pesquisa foram diagnosticados com Doença de Alzheimer Esporádica Provável segundo os critérios de *Manual of Mental Disorders* (DSM-IV) e *National Institute of Neurological and Communicative Diseases and Stroke/Alzheimer's Disease and Related Disorders Association* (NINCDS/ ADRDA) (MCKHANN et al., 1984). Todos os participantes da pesquisa foram avaliados para *Mini-Mental State Examination* (MMSE) (FOLSTEIN; FOLSTEIN; MCHUGH, 1975) e apresentaram valores de *score* médios de 13 ± 6 para pacientes e 21 ± 5 para controles ($p < 0,001$). Os valores médios de *Dementia Rating Scale* (CDR), que caracteriza o comprometimento funcional da demência de acordo com valores de 0= normal, 0,5= limítrofe, 1= leve, 2= moderado e 3= severo mostrou que, em média, os pacientes da amostra apresentaram valores de CDR=2, com gravidade moderada da demência.

A amostra foi caracterizada pelos pesquisadores do grupo de pesquisa e os grupos de casos e controles foram pareados quanto as variáveis: sexo, etnia, escolaridade e idade. O *status* dos polimorfismos do gene *APOE* foram obtidos a partir do trabalho de DE-ALMADA et al. (2012).

4.2 MÉTODOS

A análise genotípica foi realizada com DNA genômico total extraído e mantido sob condições adequadas de armazenamento e resfriamento. As sequências referências do gene *CASS4* utilizadas neste trabalho foram obtidas no banco de dados do site *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). O polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) rs911159 no gene *CASS4* foi investigado através da técnica de *Polimerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP), utilizando primers específicos, como descritos no Quadro 1, desenhados utilizando-se o site: *Primer3 v. 0.4.0* (NEFF; TURK; KALISHMAN, 2002) e gerando um amplicon de 200 pb. A localização das sequências dos primers no gene *CASS4* e sua especificidade no genoma foram verificadas através do programa: *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), ferramenta disponível no site do NCBI.

Quadro 1: Primers desenhados para a PCR do SNP rs911159 do gene *CASS4*.

Primer	Sequência 5'- 3'
CASS4 (Forward)	TGGGATTGGAGTAGCAGTCA
CASS4 (Reverse)	AGCAAACACTTCCACCAACC

As condições de padronização do PCR quanto a temperatura de amplificação e aos volumes e concentrações da reação estão exibidas nos quadros 2 e 3, respectivamente.

Quadro 2: Padronização das temperaturas da reação de PCR para o SNP rs911159 do gene *CASS4*.

Étapas	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação inicial	94°C	10'	1
Desnaturação	94°C	30''	35
Hibridização	60°C	30''	
Extensão	72°C	30''	
Extensão Final	72°C	7'	1

Quadro 3: Padronização dos volumes e concentrações da reação de PCR para o SNP rs911159 do gene CASS4.

Reagentes	Volume (10 μ l) finais)	Concentração final dos reagentes
PCR Buffer	1 μ L	1x
MgCl ₂	0,6 μ L	1,5 mM
dNTP	0,2 μ L	0,2mM
Primer F	1 μ L	0,5mM
Primer R	1 μ L	0,5mM
DNA Polimerase	0,1 μ L	0,05mM
DNA	1 μ L	40 ng/ μ L

Os produtos de PCR foram submetidos a digestão, pelo uso de uma endonuclease de restrição, onde o sítio de clivagem e a escolha da enzima correspondente, foi obtida por meio da ferramenta do site *NEBcutter*, onde foi escolhida a enzima *RsaI* (INVITROGEN). Cerca de 5 μ L de produto de PCR foram adicionados a 1 μ L de 10X Buffer e 0,1 μ L da enzima, por 15' a 37°C. O resultado foi visualizado em eletroforese em gel de poliacrilamida na concentração de 8% tampão (TBE 10X). Indivíduos homozigotos para o genótipo G apresentavam uma banda de 200 pb. Aqueles homozigotos para o alelo A apresentavam duas bandas, uma de 167pb e outra de 33pb. Indivíduos heterozigotos apresentavam três bandas no gel, de 33pb, 167 pb e 200pb.

Quadro 4: Reação de restrição por endonuclease *RSaI*, dos produtos de PCR de CASS4

Gene/SNP	Enzima	Tempo/Temperatura	Gel	Fragmentos gerados
CASS4 rs911159	<i>RSaI</i>	15min/37°C	Poli acrilamida8%	167pb e 33pb Alelo A 200pb Alelo G

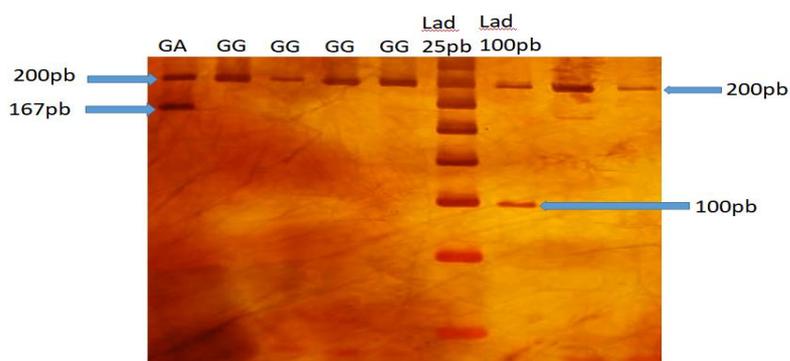


Figura 11: respectivos fragmentos gerados após clivagem enzimática e seus padrões de banca obtidos através de eletroforese em gel de poliacrilamida a 8%, corado com nitrato de prata.

4.2.1. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para o grupo de pacientes e controles foi calculado o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EH-W) por meio da ferramenta online *Online Encyclopedia for Genetic Epidemiology Studies* (OEGE) com 1 grau de liberdade (RODRIGUEZ; GAUNT; DAY, 2009). Para avaliar a associação entre os genótipos e a DA a análise estatística foi realizada no programa SPSS software versão 23.0 (IBM) para Windows. Na caracterização da amostra para comparar a idade entre pacientes e controles foi feito o teste de Mann-Whitney. O teste do Qui-quadrado foi realizado para comparação entre amostras de pacientes e controles com os dados de gênero, etnia, escolaridade e o status do APOE. Foi considerado em status do APOE a presença de pelo menos um alelo $\epsilon 4$. A etnia foi composta por indivíduos de ascendência Caucasiana e Afrodescendente. Para escolaridade, foi considerado alfabetizado e não-alfabetizado. Para análise de regressão logística os valores foram ajustados usando as variáveis idade, gênero, etnia, nível de escolaridade e status APOE $\epsilon 4$. Foram considerados significativos os valores de $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

Os dados de caracterização da amostra, referentes a composição étnica, escolaridade, idade, gênero e o status do *APOE* estão expostos na tabela 2.

Tabela 2. Características da amostra.

Variável		Pacientes 74 (100%)	Controles 69 (100%)	Valor-p
Sexo	Masculino	26 (35,1%)	20 (29,0%)	0.431 ^a
	Feminino	48 (64,9%)	49 (71,0%)	
Escolaridade	Alfabetizado	41 (55,5%)	41 (59,6%)	0.910 ^a
	Nãoalfabetizado	25 (33,7%)	24 (34,7%)	
	Nãoidentificado	8 (10,8%)	4 (5,7%)	
Origem Étnica	Caucasianos	43 (58,2%)	36 (52,2%)	0.228 ^a
	Afro-Brasileiros	26 (35,1%)	33 (47,8%)	
	Nãoidentificados	5 (6,7%)	0	
Status APOE	ε4 +	42 (56,8%)	17 (24,6%)	0.001 ^a
	ε4 -	32 (43,2%)	52 (75,4%)	
Idade (média e desvio padrão)		80,3 ± 6,5	79,5 ± 5,3	0.101 ^b

ε4+ = portadores ε4; ε4- = não portadores ε4; DP = desvio padrão; a = paciente com DA versus grupo controle pelo teste X²; b = valor de p do paciente com DA versus grupo controle pelo teste de Mann-Whitney; Valor de p ≤ 0,05 considerado significativo.

Como esperado, foi observada diferença significativa para as frequências de *APOE*_{ε4+} entre pacientes com DA (56,8%) e controles saudáveis (24,6%). Não houve diferença significativa para as variáveis escolaridade, idade, composição étnica e de gênero entre as amostras de pacientes e controles, indicando que as amostras estão pareadas quanto a estes parâmetros.

A frequência do alelo G na população total estuda, foi 0,92 ou 92%, enquanto para o alelo A, foi de 0,08 ou 8%. As frequências genóticas encontradas em cada grupo, foram de 94,6% e 73,9% para o genótipo GG entre pacientes afetados e controles saudáveis, respectivamente. Já, para o genótipo GA, os pacientes exibiram frequência genotípica de 5,4% e os controles saudáveis, 26,1%. O genótipo AA, não foi encontrado na amostra avaliada. As frequências genóticas encontradas estão em

Equilíbrio de Hardy-Weinberg (E-HW) para controles e pacientes na amostra analisada.

A análise de regressão logística está demonstrada na Tabela 3. Foi observada associação positiva do genótipo GA de rs911159 CASS4(valor de $p=0.001$) para a DA (OR= 0.187-1; IC = 0.059 – 0,59) na população estudada.

Tabela 3. Análise de frequências de genótipos e regressão logística do polimorfismo rs911159 CASS4.

Genótipo	Pacientes N= 74	Controles N= 69	p valor ^a	OR (95%IC) ^b	p valor ^c
GG	70 (94,6%)	51 (73,9%)		1 (referência)	-
GA	4 (5,4%)	18 (26,1%)	0,001	0,187 (0,059 – 0,590)	0,005
AA	0	0			

Valor de p considerado significativo $\leq 0,05$; a = paciente versus grupo controle pelo teste χ^2 ; OR = razão de chances; IC = intervalo de confiança; b = regressão logística; c = valor de p ajustado pelas variáveis idade, sexo, escolaridade e estado de APOE e4+.

6. DISCUSSÃO

A doença de Alzheimer de início tardio (DAE) é um distúrbio multifatorial que se associa com mais de vinte loci ligados ao risco da doença. Em vários casos, as funções das proteínas codificadas por estas variantes genéticas ainda não foram totalmente esclarecidas na etiologia da DAE (ROSENTHAL et al., 2014). Estudos de GWAS identificaram variantes genéticas associadas ao risco de DAE, porém, tais estudos carecem de ser replicados em populações distintas, a fim de se validar tais variantes.

Polimorfismos no gene *CASS4* foram reportados como associados a DAE em estudos de GWAS e meta-análises (HOLLINGWORTH et al., 2011; LAMBERT et al., 2013; KUNKLE, 2019). O gene *CASS4* localiza-se no cromossomo 20q13.31 e codifica uma proteína *scaffold* que faz parte da família das proteínas Cas (Crk Associated Substrate) implicadas em adesão celular, migração celular e motilidade (SINGH et al., 2008). Em relação as patologias humanas, outros membros da família Cas foram mais bem caracterizados como *Bcar1* e *Need9* (BECK et al., 2014).

Singh et al. (2008) analisaram os níveis de homologia entre os membros desta família através da análise de regiões conservadas em organismos diversos. Os pesquisadores observaram que os membros desta família de proteínas *scaffold* possuem alta homologia e compartilham características estruturais semelhantes. Tais proteínas possuem um domínio SH3, que fortemente interage com peptídios que possuem resíduos de poliprolina, como a FAK (Cinase da adesão focal). No terminal carboxi, compartilham um domínio protéico com menor grau de homologia, e quando os aminoácidos Tirosina presentes neste domínio são fosforilados, sua estrutura conformacional é alterada, permitindo a ligação com proteínas que possuem o domínio SH2 (SINGH et al., 2008).

Posteriormente à fosforilação de CAS por FAK, quinases da família SRC, ligam-se a sítios ativos gerados em CAS pelo evento de fosforilação por FAK, criando locais de ligação para CRK e proteínas associadas que reorganizam o citoesqueleto de actina, influenciando a adesão, migração, proliferação e sobrevivência celular (DENEKA et al., 2015). Ainda nesta proteína, existem feixes de um segmento dobrado helicoidalmente e rico em resíduos de serina e também um segundo feixe

tetra-helicoidal, que executa função semelhante ao domínio de adesão focal (FAT), além de estas regiões exibirem alto grau de homologia em todos os membros da família (SINGH et al., 2008). A alta homologia e conservação destes domínios refletem que muitas funções em vias de sinalização são realizadas por mais de um membro da família (BECK et al., 2014).

Os estudos relacionados à função deste grupo de proteínas, evidenciou relação destas ao câncer (BECK et al., 2014). Porém, análises genéticas implicaram polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) de genes desta família, como do gene *CASS4*, à doença de Alzheimer (HOLLINGWORTH et al., 2011; LAMBERT et al., 2013; KUNKLE, 2019). Acredita-se que a ativação e fosforilação da proteína Cas ocorre devido sua ligação com integrinas de superfície celular ativadas por adesão focal quinase (FAK) ou por seu parálogo PTK2B, também conhecido como RAFTK ou Pyk2 (HSIA et al., 2003).

A relação deste grupo de moléculas com a doença de Alzheimer pode ser explicada, pois o peptídeo β -amilóide (peptídeo A β) também pode se ligar a integrinas. Estas proteínas transmembranares mediam a ligação de células à matriz extracelular, induzindo rede de sinalização que podem levar a modulação dos efeitos neurotóxicos, iniciados pela ligação de integrinas aos peptídeos A β (ZIEGLER et al., 2008; KARRAN et al., 2011, SABO et al., 1995; BECK et al., 2014).

As integrinas podem atuar na depuração dos peptídeos A β em neurônios do hipocampo e em células microgliais, visto que por reconhecer peptídeos A β e induzir vias de sinalização, que resultam em modificação da ancoragem e estabilização do citoesqueleto, influenciando nos processos de envaginação e endocitose, afetando o processamento deste peptídeo e a resposta gerada pela célula (BI et al., 2002; BECK et al., 2014).

As integrinas quando ativadas, induzem o complexo SRC/FAK (PTK2) que são parceiros interativos essenciais da proteína Cass4 (HASSAN et al., 2018). Assim, é provável que a proteína Cass4, atue como um regulador funcional importante na patogênese da DAE, interagindo com várias outras proteínas através de vias de sinalização (BECK et al., 2014). Diante deste fato, a investigação do efeito de polimorfismos em *CASS4*, é essencial para a compreensão da patogênese da DAE.

Já foram identificadas diversas variantes genéticas do gene *CASS4* associados com a DAE. O primeiro polimorfismo associado a proteção foi o SNPrs7274581 observado em um estudo de GWAS (Lambert et al., 2013). Esta associação foi confirmada em estudos funcionais que utilizaram amostras de autopsias cerebrais de pacientes com DAE (Beecham et al., 2014). Por outro lado, o SNPrs16979934 *CASS4* foi associado com risco para a DAE que relacionou este polimorfismo com aumento da taxa de progressão da doença (WANG et al., 2015). Já o SNP rs6024870 *CASS4*, foi associado a proteção contra DAE em um estudo de meta-análise (KUNKLE et al., 2018), e outras pesquisas indicaram participação deste mesmo SNP com a progressão lenta dos sintomas de DAE e uma relação com uma menor carga de emaranhados de proteína Tau (ANDREWS; FULTON-HOWARD; GOATE, 2019; BEECHAM et al., 2014).

O polimorfismo rs911159 *CASS4*, foco da presente pesquisa, encontra-se no exon 3 deste gene e gera uma variante de sequência de codificação, que ocasiona em um códon equivalente para o aminoácido Valina [GTG] > V [GTA], constituindo uma variação sinônima, na qual não há alteração de aminoácido na proteína (NCBI, 2020).

Em um estudo de associação caso: controle, em uma população de Taiwan, o alelo de menor frequência, o alelo A, desta variante foi associada ao risco de envelhecimento e declínio cognitivo (LIN et al., 2017). Este estudo sugere que portadores do genótipo AA da variante rs911159 *CASS4* apresentam risco 7 vezes maior de envelhecimento cognitivo, em comparação com aqueles com o genótipo GG.

Este resultado difere daquele observado no presente trabalho, onde o genótipo GA foi encontrado como fator de proteção (OR= 0,187; IC= 0,059-0,590; p=0,005) contra o genótipo GG de pacientes com DAE do ES. O genótipo AA não foi encontrado na amostra analisada, provavelmente, devido ao pequeno número amostral.

Uma das hipóteses que podem explicar esta diferença quanto ao tipo de associação do SNP rs911159 *CASS4* com a DA é com base nas diferenças de *backgrounds* genéticos entre as amostras destes dois estudos. Enquanto Lin et al. (2017) estudaram indivíduos de ascendência oriental, este trabalho avaliou indivíduos brasileiros de ascendência caucasiana e afro-descendente.

Assim, os resultados desta pesquisa sugerem que o SNP rs911159 *CASS4* participe como fator de proteção contra a DAE em pacientes do ES/Brasil, apoiando a

participação de genes da via inflamatória na etiologia desta doença. Estes resultados poderão, no futuro, auxiliar em estratégias de busca de biomarcadores para a DAE. Contudo, como ainda é pequena a quantidade de pesquisas dos aspectos genéticos do gene *CASS4*, ainda são necessários mais estudos que ajudem a esclarecer a influência deste gene de via inflamatória na etiologia DAE.

7. CONCLUSÃO

Apesar da DAE ser uma doença de etiologia complexa, inúmeros esforços têm sido realizados para tentar elucidar as causas de tal patologia, ainda sem cura. Os resultados aqui encontrados, sugerem que a variante genética rs9111959 *CASS4* está associada a Doença de Alzheimer em pacientes do ES/Brasil, atuando como fator de proteção e apoiando a participação da via inflamatória na etiologia da DA. Este resultado é de suma importância, pois valida a associação de polimorfismos do gene *CASS4* na DAE em pacientes do ES, Brasil. Porém ainda existem poucas informações sobre a influência deste polimorfismo em outros locais do país e do mundo. Estes resultados inéditos poderão contribuir, no futuro, na elaboração de perfis de biomarcadores de diagnóstico para DAE favorecendo a escolha mais adequada de tratamento para os pacientes com a doença.

REFERÊNCIAS

- ANDREWS, Shea J; FULTON-HOWARD, Brian; GOATE, Alison. Protective Variants in Alzheimer ' s Disease. 2019.
- BALLARD, Clive et al. Alzheimer ' s disease. **The Lancet**, v. 377, n. 9770, p. 1019–1031, 2011. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61349-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61349-9)>.
- BECK, Tim N et al. Adaptors for disorders of the brain ? The cancer signaling proteins NEDD9 , CASS4 , and PTK2B in Alzheimer ' s disease ABSTRACT : v. 1, n. 7, 2014.
- BEECHAM, Gary W. et al. Genome-Wide Association Meta-analysis of Neuropathologic Features of Alzheimer's Disease and Related Dementias. **PLoS Genetics**, v. 10, n. 9, 2014.
- BILBO, Staci D; SCHWARZ, Jaclyn M. The immune system and developmental programming of brain and behavior. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 33, n. 3, p. 267–286, 2012.
- CALSOLARO, Valeria; EDISON, Paul. Neuroinflammation in Alzheimer ' s disease : Current evidence and future directions. v. 12, p. 719–732, 2016.
- CARLOS, Fernanda Shayonally Araújo; PEREIRA, Fábio Rodrigo Araújo. Principais Doenças Crônicas Acometidas Em Idosos. **Congresso nacional de envelhecimento humano**, v. 2, n. 1, p. 1–5, 2015. Disponível em: <http://www.editorarealize.com.br/revistas/cieh/trabalhos/TRABALHO_EV040_MD4_SA2_ID2624_11092015161625.pdf>.
- CICERO, M T. De Senectute (44 BC). 1923.
- CIPRIANI, G.; DANTI, S.; CARLESI, C. Three men in a (same) boat: Alzheimer, Pick, Lewy. Historical notes. **European Geriatric Medicine**, v. 7, n. 6, p. 526–530, dez. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1878764916301061>>.
- CIPRIANI, Gabriele et al. Alzheimer and his disease: A brief history. **Neurological Sciences**, v. 32, n. 2, p. 275–279, 2011.
- CUSTODIO, Nilton et al. Dementia in Latin America: Epidemiological evidence and implications for public policy. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 9, n. JUL, p. 1–11, 2017.
- ENGELHARDT, Elias; DA MOTA GOMES, Marleide. O 100o aniversário de morte de Alzheimer e sua contribuição para uma melhor compreensão da Demência senil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 73, n. 2, p. 159–162, 2015.
- FERREIRA, Sergio T et al. Inflammation , defective insulin signaling , and neuronal dysfunction in Alzheimer ' s disease. **JALZ**, v. 10, n. 1, p. S76–S83, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jalz.2013.12.010>>.
- FRANCO-BOCANEGRA, Diana K et al. Molecular Mechanisms of Microglial Motility :

Changes in Ageing and Alzheimer ' s Disease. n. II, p. 1–21, 2019.

FRIDMAN, Cintia et al. Alteracoes geneticas na doenca de Alzheimer. **Revista de Psiquiatria Clinica**, v. 31, n. 1, p. 19–25, 2004.

GLENN, J A et al. Characterisation of ramified microglial cells : detailed morphology , morphological plasticity and proliferative capability. p. 109–118, 1992.

GOEDERT, Michel; GHETTI, Bernardino. Alois Alzheimer: His life and times. **Brain Pathology**, v. 17, n. 1, p. 57–62, 2007.

GUERREIRO, Rita J.; GUSTAFSON, Deborah R.; HARDY, John. The genetic architecture of Alzheimer's disease: Beyond APP, PSENS and APOE. **Neurobiology of Aging**, v. 33, n. 3, p. 437–456, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.03.025>>.

GUO, Tong; NOBLE, Wendy; HANGER, Diane P. Roles of Tau protein in health and disease. **Acta Neuropathologica**, v. 133, n. 5, p. 665–704, 2017.

HAROLD, Denise et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease, and shows evidence for additional susceptibility genes. **Nature genetics**, v. 41, n. 10, p. 1088–1093, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2845877/>>.

I, Maurílio De Souza Cazarim et al. Perspectives for treating Alzheimer ' s disease : a review on promising pharmacological substances Perspectivas no tratamento da doença de Alzheimer : uma revisão sobre substâncias farmacológicas promissoras. v. 134, n. 4, 2016.

JOUANNE, Marie; RAULT, Sylvain; VOISIN-CHIRET, Anne Sophie. Tau protein aggregation in Alzheimer's disease: An attractive target for the development of novel therapeutic agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 139, p. 153–167, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.07.070>>.

KARCH, Celeste M.; GOATE, Alison M. Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis. **Biological Psychiatry**, v. 77, n. 1, p. 43–51, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.05.006>>.

KINNEY, Jefferson W. et al. Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. **Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions**, v. 4, p. 575–590, 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352873718300490>>.

KUNKLE, BRIAN W. GRENIER-BOLEY B2,3,4, SIMS R5,6, BIS JC7, DAMOTTE V2,3,4, NAJ AC8, BOLAND A9, VRONSKAYA M5, VAN DER LEE SJ10, AMLIE-WOLF A11, BELLENGUEZ C2,3,4, FRIZATTI A5, CHOURAKI V2,3,4,12,13, MARTIN ER14, SLEEGERS K15,16, BADARINARAYAN N5, JAKOBSDOT, Pericak-Vance MA313. Genetic meta-analysis of diagnosed Alzheimer's disease identifies new risk loci and implicates A β , Tau, immunity and lipid processing. **Nature Genetics**, v. 51, n. MARCH, p. 1423-, 2019.

LAMBERT, Jean Charles et al. Genome-wide association study identifies variants at

CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. **Nature Genetics**, v. 41, n. 10, p. 1094–1099, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ng.439>>.

LANE, C A; HARDY, J; SCHOTT, J M. Alzheimer's disease. **European Journal of Neurology**, v. 25, n. 1, p. 59–70, [s.d.]. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ene.13439>>.

LEIBING, Annette. DOENÇA DE ALZHEIMER - (UM) A HISTÓRIA. n. 21, p. 5–9, 1998.

LICASTRO, Federico; PORCELLINI, Elisa. Persistent infections, immune-senescence and Alzheimer's disease. **Oncoscience**, v. 3, n. May, p. 5–6, 2016. Disponível em: <www.impactjournals.com/oncoscience>.

LIN, Eugene et al. Association and interaction effects of Alzheimer's disease-associated genes and lifestyle on cognitive aging in older adults in a Taiwanese population. **Oncotarget**, v. 8, n. 15, p. 24077–24087, 2017. Disponível em: <<http://www.oncotarget.com/abstract/15269>>.

MARTIN, Ludovic et al. Tau protein kinases: Involvement in Alzheimer's disease. **Ageing Research Reviews**, v. 12, n. 1, p. 289–309, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2012.06.003>>.

MORRIS, Jill K. et al. Is Alzheimer's disease a systemic disease? **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1842, n. 9, p. 1340–1349, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.04.012>>.

MRAK, Robert E. Microglia in Alzheimer Brain : A Neuropathological Perspective. v. 2012, 2012.

N. C., Berchtold; C. W., Cotman. Evolution in the Conceptualization of Dementia and Alzheimer ' s Disease : Greco-Roman Period to the 1960s. **Neurobiology of Aging**, v. 19, n. 3, p. 173–189, 1998.

O'BRIEN, Richard J; WONG, Philip C. Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. **Annual review of neuroscience**, v. 34, p. 185–204, 2011.

PAPAVRAMIDOU, Niki. The ancient history of dementia. **Neurological Sciences**, v. 39, n. 11, p. 2011–2016, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10072-018-3501-4>>.

PIMENOVA, Anna A.; RAJ, Towfique; GOATE, Alison M. Untangling Genetic Risk for Alzheimer's Disease. **Biological Psychiatry**, v. 83, n. 4, p. 300–310, 2018.

QUINTANILLA, Rodrigo A et al. Interleukin-6 induces Alzheimer-type phosphorylation of Tau protein by deregulating the cdk5 / p35 pathway. v. 295, p. 245–257, 2004.

RAFAEL DE CASTILHOS VIDOR; THIAGO MAMORU SAKAE; FLAVIO RICARDO LIBERALI MAGAJEWSKI. ARTIGO ORIGINAL ALZHEIMER DISEASE MORTALITY AND HUMAN DEVELOPMENT IN 21 ST CENTURY : AN ECOLOGICAL STUDY IN THE GREATEST BRAZILIAN. v. 48, n. 1, p. 94–107, 2019.

ROSENTHAL, Samantha L.; KAMBOH, M. Ilyas. Late-Onset Alzheimer's Disease Genes and the Potentially Implicated Pathways. **Current Genetic Medicine Reports**, v. 2, n. 2, p. 85–101, 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s40142-014-0034-x>>.

SANTOS, Felipe; ALEXANDRA, Cláudia; SILVEIRA, Bolela. Alzheimer, sintomas e grupos: uma revisão integrativa. Caetano, L.A.O.; Silva, F.S.; Silveira, C.A.B. p. 84–93, 2016.

SHAO, Wen; PENG, Dantao; WANG, Xiaomin. Genetics of Alzheimer's disease: From pathogenesis to clinical usage. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 45, p. 1–8, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jocn.2017.06.074>>.

SINGH, Mahendra K et al. A Novel Cas Family Member , HEPL , Regulates FAK and Cell Spreading. v. 19, n. April, p. 1627–1636, 2008.

SMITH, Margie. Genetics of Alzheimer's disease. **Dementia, Fifth Edition**, p. 519–527, 2017.

TAN, Jing Zhi A.; GLEESON, Paul A. The role of membrane trafficking in the processing of amyloid precursor protein and production of amyloid peptides in Alzheimer's disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1861, n. 4, p. 697–712, 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005273619300070>>.

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

TOMIYAMA, Takami et al. A new amyloid β variant favoring oligomerization in Alzheimer's-type dementia. **Annals of Neurology**, v. 63, n. 3, p. 377–387, 2008.

ULLAND, Tyler K.; COLONNA, Marco. TREM2 — a key player in microglial biology and Alzheimer disease. **Nature Reviews Neurology**, v. 14, n. November, 2018. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41582-018-0072-1>>.

VILATELA, María Elisa Alonso; LÓPEZ-LÓPEZ, Marisol; YESCAS-GÓMEZ, Petra. Genetics of Alzheimer's disease. **Archives of medical research**, v. 43, n. 8, p. 622–631, 2012.

YANG, Hyun Duk et al. History of Alzheimer's Disease. **Dementia and Neurocognitive Disorders**, v. 15, n. 4, p. 115, 2016. Disponível em: <<https://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.12779/dnd.2016.15.4.115>>.

8. American Psychiatric Association. Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais –

DSM-5. 5. ed. Porto Alegre: Artmed; 2013.

Huang, Y. & Mucke, L. (2012). Mecanismos de Alzheimer e estratégias terapêuticas. *Cell*, 148 (6), 1204–1222. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.040>

Albert MS, DeKosky ST, Dickson D, Dubois B, Feldman HH, Fox NC, et al. The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2011;7(3):270-9.

Caramelli P, Robitaille Y, Laroche-Cholette A, Nitrini R, Gauvreau D, Joannette Y, et al. Structural correlates of cognitive deficits in a selected group of patients with Alzheimer's disease. *Neuropsychiatry Neuropsychol Behav Neurol*. 1998;11(4):184-90.

Bayles KA, Tomoeda CK, Trosset MW. Relation of linguistic communication abilities of Alzheimer's patients to stage of disease. *Brain Lang*. 1992;42(4):454-72.

13. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR, Jr., Kawas CH, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *AlzheimersDement*. 2011;7(3):263-9.

MAGALHÃES, Thamires Naela Cardoso et al. Inflamação sistêmica e os principais biomarcadores da Doença de Alzheimer = Systemic inflammation and Alzheimer's disease biomarkers. 2017.

FALCO, Anna De et al. DOENÇA DE ALZHEIMER: HIPÓTESES ETIOLÓGICAS E PERSPECTIVAS DE TRATAMENTO. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 39, n. 1, p. 63-80, Jan. 2016. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422016000100063&lng=en&nrm=iso>. access on 29 Apr. 2020. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20150152>.

8. Serrano-Pozo, A.; Frosch, M. P.; Masliah, E.; Hyman, B. T.; *Cold Spring Harbor Perspect. Biol*. 2011, 1, a006189.

9. Smith, M. A. C.; *Revista Brasileira de Psiquiatria* 1999, 21, 03.

10. Hardman, J. G.; Limbird, L. E.; Gilman, A. G.; Goodman, L. S.; Gilman, A.; Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics, McGraw-Hill: New York, 1996.

Síntese de indicadores sociais : uma análise das condições de vida da população brasileira : 2016 / IBGE, Coordenação de População e Indicadores Sociais. - Rio de Janeiro : IBGE, 2016 146 p. - (Estudos e pesquisas. Informação demográfica e socioeconômica, ISSN 1516-3296 ; n. 36)

CHEIGNON, C. et al. Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. **Redox biology**, v. 14, p. 450-464, 2018.

Pham E., Crews L., Ubhi K., Hansen L., Adame A., Cartier A., Salmon D., Galasko D., Michael S., Savas J.N., Yates J.R., Glabe C., Masliah E. Progressive accumulation of amyloid-beta oligomers in Alzheimer's disease and in amyloid precursor protein transgenic mice is accompanied by selective alterations in synaptic scaffold proteins. *FEBS J.* 2010;277(14):3051–3067.

FORLONI, Gianluigi et al. Oligomeropathies and pathogenesis of Alzheimer and Parkinson's diseases. **Movement Disorders**, v. 31, n. 6, p. 771-781, 2016.

DESHPANDE, Atul et al. Different conformations of amyloid β induce neurotoxicity by distinct mechanisms in human cortical neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 22, p. 6011-6018, 2006.

16. Jack CR Jr., Knopman DS, Jagust WJ, et al. Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: an updated hypothetical model of dynamic biomarkers. *Lancet Neuroi.* 2013. February;12(2):207–216

18. Shin RW, Iwaki T, Kitamoto T, et al. O pré-tratamento com autoclave hidratada aumenta a imunorreatividade da Tau nos tecidos cerebrais normais e com doença de Alzheimer fixados em formalina . *LabInvest* . 1991. maio; 64 (5) : 693-702.

Mandelkew EM, Mandelkew E. Bioquímica e biologia celular da proteína Tau na degeneração neurofibrilar . *Cold Spring Harb Perspect Med* . 2012. julho; 2 (7) : a006247.

Arendt T, Stieler JT, Holzer M. Tau and Tauopathies. *Brain Res Bull.* 2016. September;126(Pt 3):238–292.

Love JE, Hayden EJ, Rohn IT. Alternative splicing in Alzheimer's disease. *J Parkinsons Dis Alzheimers Dis.* 2015. August;2(2). DOI:10.13188/2376-922X.1000010.

HOLTZMAN, David M. et al. Tau: from research to clinical development. **Alzheimer's & Dementia**, v. 12, n. 10, p. 1033-1039, 2016.

Hoskin, JL, Sabbagh, MN, Al-Hasan, Y. & Decourt, B. (2019). Imunoterapias de Tau para a doença de Alzheimer. *Opinião de especialistas em medicamentos sob investigação*, 28 (6), 545–554. <https://doi.org/10.1080/13543784.2019.1619694>

Hsia, DA, Mitra, SK, Hauck, CR, Streblow, DN, Nelson, JA, Ilic, D., Huang, S., Li, E., Nemerow, GR, Leng, J., Spencer, KS, Cheresch, DA; Schlaepfer, DD (2003). Regulação diferencial da motilidade celular e invasão por FAK. *The Journal of cell biology*, 160 (5), 753-767. <https://doi.org/10.1083/jcb.200212114>

Beck, T. N., Nicolas, E., Kopp, M. C., & Golemis, E. A. (2014). Adaptors for disorders of the brain? The cancer signaling proteins NEDD9, CASS4, and PTK2B in Alzheimer's disease. *Oncoscience*, 1(7), 486–503. <https://doi.org/10.18632/oncoscience.64>

Ziegler WH, Gingras AR, Critchley DR, Emsley J (2008) Integrin connections to the cytoskeleton through talin and vinculin. *Biochem Soc Trans* 36(Pt 2):235–239

Karran E, Mercken M, De Strooper B (2011) The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 10(9):698–712

Rosenthal, SL, Barmada, MM, Wang, X., Demirci, FY e Kamboh, MI (2014). Conectando os pontos: potencial de integração de dados para identificar SNPs regulatórios nos achados do GWAS na doença de Alzheimer de início tardio. *PloSum*, 9 (4), e95152. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095152>

Tikhmyanova N, Little JL, Golemis EA. CAS proteins in normal and pathological cell growth control. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*. 2010;67(7):1025–1048.

Cabodi S, Camacho-Leal MD, Di Stefano P, Defilippi P. Integrin signalling adaptors: not only figurants in the cancer story. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(12):858–870.

Guerrero MS, Parsons JT, Bouton AH. Cas and NEDD9 Contribute to Tumor Progression through Dynamic Regulation of the Cytoskeleton. *Genes & cancer*. 2012;3(5-6):371–381.

Nikonova AS, Gaponova AV, Kudinov AE, Golemis EA. CAS proteins in health and disease: An update. *IUBMB LIFE*. 2014 [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

Sabo S, Lambert MP, Kessey K et al (1995) Interaction of beta-amyloid peptides with integrins in a human nerve cell line. *Neurosci Lett* 184(1):25–28

ANAND, R .; GILL, Kiran Dip; MAHDI, Abbas Ali. Terapêutica da doença de Alzheimer: passado, presente e futuro. **Neuropharmacology**, v. 76, p. 27-50, 2014.

Kihara T, Sawada H, Nakamizo T, Kanki R, Yamashita H, Maelicke A, et al. Galantamine modulates nicotinic receptor and blocks abeta-enhanced glutamate toxicity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;325(3):976-82.

Grossberg GT. Cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: getting on and staying on. *Curr The Res*. 2003;64(4):216-35.

LUCAS HENRIQUE GONZAGA DE OLIVEIRA

2020