

FACULDADE DE MEDICINA DE MARÍLIA

ROGER WILLIAM DELÁBIO

**CARACTERIZAÇÃO DOS GENES DAS PRESENILINAS E CITOCINAS
EM AMOSTRAS DE ENCÉFALO E SANGUE DE PACIENTES COM
DOENÇA DE ALZHEIMER.**

MARÍLIA
2013

Roger William Delábio

Caracterização dos genes das presenilinas e citocinas em amostras de encéfalo e sangue de pacientes com Doença de Alzheimer.

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Acadêmico em “Saúde e Envelhecimento”, da Faculdade de Medicina de Marília, para obtenção do título de Mestre. Área de concentração: “Saúde e envelhecimento”.

Orientador: Prof. Dr. Spencer Luiz Marques Payão.

Coorientador: Profa. Dra. Marília de Arruda Cardoso Smith.

Marília
2013

Autorizo a reprodução parcial ou total deste trabalho, para fins de estudo e pesquisa,
desde que citada a fonte.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da Faculdade de Medicina de Marília

Delabio, Roger William

Caracterização dos genes das presenilinas e citocinas em amostras de encéfalo e sangue de pacientes com Doença de Alzheimer / Roger William Delabio. - - Marília, 2013.

51 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde e Envelhecimento) - Faculdade de Medicina de Marília.

1. Doença de Alzheimer. 2. Sangue. 3. Tecido encefálico. 4. Presenilinas. 5. Interleucinas. 6. Reação em cadeia da polimerase em tempo real.

Roger William Delábio

Caracterização dos Genes das Presenilinas e Citocinas em Amostras de Encéfalo e Sangue de Pacientes com Doença de Alzheimer.

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Acadêmico em “Saúde e Envelhecimento”, da Faculdade de Medicina de Marília, para obtenção do título de Mestre. Área de concentração: “Saúde e envelhecimento”.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Spencer Luiz Marques Payão
Faculdade de Medicina de Marília

Prof^a. Dr^a. Elizabeth Suchi Chen
Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP

Prof. Dr. Lucas Trevizani Rasmussen
Universidade do Sagrado Coração – USC Bauru

Data da aprovação: _____

Dedico esse trabalho:

*Primeiramente a **Deus**, pois sem a sua presença nada tem sentido.*

*Aos meus pais **Valdemar Delabio** e **Mercedes L. Delabio** pelo apoio, paciência e por sempre acreditarem em mim.*

*Ao meu irmão **Cesar A. Delabio** e Família pelo carinho, apoio incondicional e torcida.*

*A minha Querida esposa **Josianne T. Fukasawa** por fazer parte principalmente da minha vida da minha história, por estar sempre ao meu lado.*

*A minha Querida e Amada filha **Maria Clara Fukasawa Delabio**, entrou em meu mundo e me fez entender realmente qual o verdadeiro sentido da Vida.*

“Quando se Acredita de verdade e tem Fé, nada é Impossível”.

Roger William Delábio

AGRADECIMENTOS

*Obrigado ao meu Amigo (Irmão), Chefe e Orientador, **Prof. Dr. Spencer Luiz Marques Payão** pela confiança, oportunidade, paciência, por estar sempre pronto para ajudar e compartilhar conhecimento e experiência não só de trabalho, mas principalmente de Vida, obrigado por fazer parte do meu crescimento profissional e como ser humano. Obrigado, tenho muita honra e orgulho de trabalharmos juntos.*

*Obrigado ao Prof. Dr. **Lucas Trevizani Rasmusen (Dimi)**, um grande Amigo e Professor. Agradeço sempre por Deus colocar pessoas boas no meu caminho e com certeza o Dimi é uma delas. Sou muito grato pelo companheirismo, confiança e pela ajuda. Valeu.*

*Obrigado a meu grande **Amigo (Irmão) Marcel Inada** pelo apoio, companheirismo, por sempre acreditar e me dar forças, com certeza faz parte das pessoas boas que Deus pôs em meu caminho. Muito Obrigado pela sua Amizade.*

*Obrigado a meu Amigo e Professor **Dr. Wilson Baleotti Junior** pela ajuda, orientação e exemplo de profissionalismo desde a época da Faculdade, obrigado pela confiança e pelo seu apoio no início e no decorrer de minha vida profissional. Muito Obrigado.*

*Obrigado a meu grande Amigo e Professor **Dr. Sidonio Quaresma Junior (Juninho)** pela confiança, ajuda, incentivo e principalmente pela amizade e respeito. Muito obrigado.*

*Ao grande Amigo Professor **Ricardo H. Yanasse** obrigado pela ajuda, pelo apoio, respeito e confiança. Muito obrigado.*

*Obrigado Prof^a Dr^a. **Marília Smith** pelo apoio, confiança, incentivo, e principalmente pelo exemplo de ética, profissionalismo e respeito ao próximo, obrigado por fazer parte do meu crescimento profissional e como ser humano. Muito Obrigado, tenho muita honra em fazer parte do seu grupo de pesquisa.*

*Obrigado a Prof^a Dr^a. **Silvia Rogato** pelo apoio, confiança e em por várias vezes ter aberto as portas do seu Laboratório para que eu pudesse aprender mais sobre a Biologia Molecular, muito obrigado.*

*Obrigado Prof^a Dr^a. **Elizabeth Chen** pela colaboração, confiança, ajuda, atenção, disponibilidade, troca de experiência em Biologia Molecular e pelas publicações em conjunto.*

*Obrigado Prof Dr. **Gustavo Tureki** pela colaboração, confiança e amostras de encéfalo fornecidas pelo The Douglas - Bell Canada Brain Bank.*

*Obrigado Prof Dr. **João Villares** pela colaboração, confiança, disponibilidade, atenção e amostras de encéfalo fornecidas pelo Banco de Encéfalo da UNIFESP.*

*Obrigado Prof Dr. **Paulo Henrique Ferreira Bertolucci** e Prof^a Dr^a. **Thais Minett** que foram importantes no recrutamento dos pacientes com Doença de Alzheimer e coleta das amostras.*

*Obrigado as amigas **Paty** e **Tuti** pela ajuda, disponibilidade, troca de experiência em Biologia Molecular e pelas publicações em conjunto.*

*Obrigado Prof^a Dr^a. **Sandra Drigo** pela paciência, ajuda, disponibilidade e por nos orientar nas técnicas e análise da PCR em Tempo real.*

*Obrigado ao Amigo e Professor **Dr. Gustavo Viani** pela colaboração, incentivo, e análise estatística dos dados.*

Obrigado a todos os pacientes com Doença de Alzheimer, idosos, jovens e familiares pela confiança em nosso trabalho.

*Sou eternamente grato a minha **FAMÍLIA**, meu **pai Valdemar e minha mãe Mercedes**, obrigado pelo exemplo de Vida, Humanidade, Amor e Humildade que vocês sempre me deram, agradeço a Deus por ter me escolhido para fazer parte desta **FAMÍLIA**, ao meu **irmão Cesar** pelo carinho, apoio, confiança, em realmente acreditar e me dar forças nas alegrias e nos tropeços ao longo da Vida. Muito Obrigado.*

*Obrigado a meus queridos sobrinhos **Victor, Luca, Enzo, Giulia e Gabi** .*

*Muito Obrigado a minha querida esposa **Josi**, por participar e compartilhar minhas conquistas, obrigado pela paciência, confiança e amor. Muito obrigado por fazer parte da minha Vida. Agradeço a Deus por poder compartilhar com você o mais puro dos sentimentos que é o Amor que sentimos e principalmente o Amor pela nossa querida e Amada Filha Maria Clara o maior presente que Deus nos deu.*

*Minha Querida e Amada filha **Maria Clara** obrigado pelo Amor e pelo carinho, pois, é este seu Amor que me motiva e me faz crescer e tentar ser uma pessoa melhora cada dia, você tornou meu mundo melhor (bagunçado e cor de rosa) me fez conhecer o que é o Amor de verdade. Muito obrigado, que Deus sempre te Ilumine e te Abençoe.*

*A Todo Pessoal do **Laboratório de Genética da Faculdade de Medicina de Marília, Ligia, Rosi, Fer Miller, Fer Barbi, Dani, Cris, Neto**, muito obrigado a todos pelo apoio, respeito, ajuda e confiança.*

*A meus grandes amigos do **Laboratório de Imunohematologia da Faculdade de Medicina de Marília**, onde foi realmente onde comecei minha vida profissional, agradeço muito pelo carinho, ensinamentos, companheirismo e troca de experiência profissional e de vida, **Marcinha, Marcelão e Sueli Wiira**, muito obrigada a todos pelo apoio, respeito e confiança.*

*Agradeço a **Todos da Universidade Federal de São Paulo** pela ajuda, apoio, troca de conhecimento e atenção.*

*Agradeço a **Todos da Faculdade de Medicina de Marília** pela ajuda, apoio, troca de conhecimento, atenção e acolhimento.*

*Obrigado a **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo apoio financeiro (Processo nº 2009/15857-9).*

Obrigado a todos que participaram direta ou indiretamente deste trabalho.

“TENHAMOS UM CORAÇÃO BRANDO”

Relaxando todas as tensões, conservemos o coração em estado natural, brando e suave. Tudo será harmoniosamente realizado, sem precipitação e com facilidade, se confiarmos tudo a Deus e acreditarmos que “não sou eu que faço, é Deus quem me faz realizar”.

Massaharu Taniguchi – Convite a Felicidade

RESUMO

Introdução: A Doença de Alzheimer (DA) é definida como uma afecção neurodegenerativa irreversível e progressiva, de início insidioso caracterizada principalmente pela diminuição da cognição, perda de memória e confusão mental.

Objetivos: Quantificar a expressão do mRNA dos genes das Presenilinas 1 e 2, e interleucinas 1 β e 8 e avaliar as frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos do gene *IL1 β* , *IL8* e *IL1RN*, em amostras de encéfalo e sangue de pacientes com DA e controles.

Material e Métodos: No presente trabalho, foram utilizadas 247 amostras de sangue: 82 amostras de pacientes com DA, 83 idosos saudáveis e 82 jovens saudáveis e 156 amostras de três regiões cerebrais (córtex entorrinal, córtex auditivo e hipocampo) de 52 encéfalos de 26 pacientes com DA e 26 idosos saudáveis. Foram utilizadas as técnicas de qRT-PCR e PCR-RFLP/VNTR. **Resultados:** Em relação às amostras de sangue, foi observado um aumento estatisticamente significativo na expressão do gene da *IL8* e uma diminuição estatisticamente significativa nos níveis de expressão do gene da *PSEN2* no grupo de pacientes com DA em relação a idosos e jovens saudáveis. Quanto a caracterização dos genótipos da *IL-8*, encontramos uma maior frequência do Alelo A em pacientes com DA; já o estudo dos haplótipos dos genes da *IL1 β* e *IL1RN* revelaram um fator protetor ou de risco para a DA quando comparado com idosos saudáveis. Em relação às amostras de encéfalo, foi verificado um aumento estatisticamente significativo na expressão do gene da *IL-8* em pacientes com DA em relação a idosos saudáveis, comparando todas as áreas simultaneamente. Quando realizada a comparação individual entre as áreas, as regiões do córtex entorrinal e córtex auditivo apresentaram aumento estatisticamente significativo dos níveis de expressão do gene da *IL-8* em pacientes com doença de Alzheimer. Verificamos uma diminuição estatisticamente significativa nos níveis de expressão da *PSEN2* em pacientes com DA em relação aos idosos saudáveis, comparando todas as regiões encefálicas simultaneamente. Quando a comparação foi realizada por região encefálica, pacientes com DA apresentaram uma diminuição estatisticamente significativa em relação a idosos saudáveis na região do córtex auditivo. Comparando as regiões encefálicas no grupo de pacientes com DA houve uma diminuição estatisticamente significativa no córtex auditivo em relação ao córtex

entorrinal. **Conclusões:** Observamos que em amostras de sangue houve uma maior expressão da *IL8* e uma menor expressão da *PSEN2* bem como uma maior prevalência do alelo A na DA e que haplotipos da *IL1 β* e *IL1RN* revelaram um fator protetor ou de risco para a DA. Em amostras de encéfalo houve uma maior expressão da *IL8* preferencialmente nas regiões do córtex entorrinal e auditivo e uma menor expressão da *PSEN2* preferencialmente na região do córtex auditivo em relação ao córtex entorrinal.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer. Sangue periférico. Encéfalo. Presenilinas. Interleucinas. Reação em cadeia da polimerase em tempo real.

ABSTRACT

Introduction: Alzheimer's disease (AD) is defined as an irreversible, progressive neurodegenerative disorder of insidious onset characterized mainly by decreased cognition, memory loss and mental confusion. **Objectives:** To quantify mRNA expression of genes of Presenilins 1 and 2, and interleukins 1 β and 8 and evaluate the allelic and genotypic frequencies of polymorphisms of genes *IL-1 β* , *IL8* and *IL1RN* gene in samples from brain and blood of patients with AD and controls. **Material and Methods:** In our study, we analysed 247 blood samples comprising 82 samples from patients with AD, 83 healthy elderly and 82 healthy young individuals and 156 samples from three brain regions (entorhinal cortex, auditory cortex and hippocampus) of 52 brains, comprising of 26 patients with AD and 26 healthy elderly. The qRT-PCR techniques were used and PCR-RFLP/VNTR. **Results:** In relation of blood samples, a statistically significant increase in the expression of the *IL8* gene and a statistically significant decrease in the levels of expression of *PSEN2* gene in patients with AD compared to healthy elderly and young were observed. Regarding the characterization of genotypes of *IL-8*, we found a higher frequency of allele A in AD patients, whereas the study of gene haplotypes of *IL1 β* and *IL1RN* revealed a protective factor or a risk for AD compared with healthy elderly. Regarding brain samples, we have found a statistically significant increase in expression of *IL-8* gene in AD patients compared to healthy individuals, comparing all the regions simultaneously, when the comparison made between the individual areas, regions of the cortex entorhinal cortex and auditory statistically significant increase in levels of expression of *IL-8* gene in patients with Alzheimer's disease. We observed a statistically significant decrease in the levels of expression of *PSEN2* in AD patients in relation to healthy elderly, considering all brain regions at the same time. When we compared each brain region, AD patients showed a statistically significant decrease in relation to healthy elderly in the auditory cortex region. The AD group showed a statistically significant decrease in the auditory cortex in relation to the entorhinal cortex. **Conclusions:** We observed that in blood samples was greater expression of *IL8* and a lower expression of *PSEN2* well as a higher prevalence of the A allele in AD and that the *IL-1 β* and haplotypes *IL1RN* revealed a protective or

risk factor for AD. In brain samples was greater expression of *IL8* preferentially in regions of the entorhinal and auditory cortex and a lower expression of *PSEN2* preferably in the region of the auditory cortex in relation to the entorhinal cortex.

Key-words: Alzheimer Disease. Blood. Brain. Presenilins. Interleukins. Real-time polymerase chain reaction.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. A: Amostras de RNA extraídas de tecido encefálico e obtidas em colaboração com a Universidade Federal de São Paulo – SP. B: Amostras de RNA extraídas de tecido encefálico e obtidas em colaboração com *The Douglas - Bell Canada Brain Bank* – Montreal Quebec – Canadá... 27
- Figura 2:** Plot contendo o resultado das curvas de amplificação dos genes das interleucinas A - 1 β (gene referencia *GAPDH*) e B - 8 (gene referencia *B2M*) respectivamente..... 31
- Figura 3:** A) gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo para visualização de um produto da PCR de 349pb. Amostras de pacientes com DA, slots de 1 a 6; Controle negativo slot 7 e Marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen) slot 8. B) Gel de agarose 3%, corado com brometo de etídeo contendo a caracterização dos genótipos pela técnica de RFLP, utilizando a enzima de restrição *MunI* (Fermentas). Slot 1 – alelo TT; slots 2, 3, 5 e 6 – alelo TA e slot 4 – alelo AA; slot 7 - Marcador de peso molecular de 25pb (Invitrogen)..... 34
- Figura 4:** Plot contendo o resultado das curvas de amplificação dos genes A - Presenilinas 1 (gene referencia *GAPDH*) e B - Presenilinas 2 (gene referencia *B2M*) respectivamente. .. 36
- Figura 5:** Plot contendo o resultado das curvas de amplificação dos genes das interleucinas A - 1 β (gene referencia *B2M*) e B - 8 (gene referencia *UBC*) respectivamente..... 38
- Figura 6:** Plot contendo o resultado das curvas de amplificação dos genes A - Presenilinas 1 (gene referencia *GAPDH*) e B - Presenilinas 2 (gene referencia *ISOC*) respectivamente.. 41

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1:** Expressão relativa do gene da Interleucina 1 β , em amostras de sangue, de pacientes com DA, Idosos Sadios e Jovens Sadios. DA: Pacientes com doença de Alzheimer; CI: idosos sadios; CJ: Jovens Sadios..... 31
- Gráfico 2:** Expressão relativa do gene da Interleucina 8, em amostras de sangue, de pacientes com DA, Idosos Sadios e Jovens Sadios. DA: Pacientes com doença de Alzheimer; CI: idosos sadios; CJ: Jovens Sadios..... 32
- Gráfico 3:** Expressão relativa dos genes das Presenilinas 1 e 2, em amostras de sangue, de pacientes com DA, Idosos Sadios e Jovens Sadios. DA: Pacientes com doença de Alzheimer; CI: idosos sadios; CJ: Jovens Sadios..... 36
- Gráfico 4:** Expressão relativa dos genes das Interleucinas 1 β , em tecido cerebral, de idosos sadios e pacientes com Doença de Alzheimer. Comparação dos valores de 2- $\Delta\Delta$ CT entre os grupos estudados. 39
- Gráfico 5:** Expressão relativa dos genes das Interleucinas 8, em amostras de encéfalo, de pacientes com DA. Comparação dos valores de 2- $\Delta\Delta$ CT entre os grupos estudados. 39
- Gráfico 6:** Expressão relativa do gene da Presenilina 1 em amostras de encéfalo de idosos sadios e pacientes com Doença de Alzheimer. Comparação dos valores de 2- $\Delta\Delta$ CT entre os grupos estudados. 42
- Gráfico 7:** Expressão relativa do gene da Presenilina 1 em amostras de encéfalo de idosos sadios e pacientes com Doença de Alzheimer. Comparação dos valores de 2- $\Delta\Delta$ CT entre os grupos estudados. 42

LISTA DE TABELAS E QUADRO

- Quadro 1:** Procedência e o número amostral dos tecidos cerebral e sanguíneo, de controles e pacientes com DA, que foram utilizados no presente trabalho..... 25
- Tabela 1:** Distribuição dos alelos da Interleucina 8 em amostras de sangue de pacientes com doença de Alzheimer (DA), idosos sadios (CI) e jovens sadios (CJ)..... 35
- Tabela 2:** Distribuição dos genótipos da Interleucina 8 em amostras de sangue de pacientes com doença de Alzheimer (DA), idosos sadios (CI) e jovens sadios (CJ). 35

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A β	Peptídeo β -Amilóide
ADRNA	<i>Alzheimer Disease and Related Disorders</i>
ApoE	Apolipoproteína E
ApoE4	Alelo E4 do Gene da Apolipoproteína E
APP	Proteína Precursora da β -amilóide
ATP	Trifosfato de adenosina
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico Complementar
DA	Doença de Alzheimer
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
IGS	Espaço Intergênico
IL	Interleucina
IL1	Interleucina 1
IL1RN	Receptor antagonista da Interleucina 1
IL8	Interleucina 8
kb	Kilobase
NINCDS	<i>National Institute of Communicative Disease and Stroke</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PHF	Pares de Filamentos Espiralados
PSEN1	Presenilina 1
PSEN2	Presenilina 2
qRT-PCR	<i>Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
rRNA	Ácido Ribonucleico Ribossômico
VNTR	Variable number tandem repeat

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Componente genético e aspectos moleculares da doença de Alzheimer.....	18
1.2 Genes das Presenilinas, interleucinas e a Doença de Alzheimer.....	20
1.3 PCR em tempo real (qRT- PCR) e suas aplicações.....	21
2 OBJETIVOS	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Casuística.....	23
3.1.1 Sangue periférico	23
3.1.2 Encéfalo	24
3.2 Extração de DNA.....	25
3.2.1 Análise dos polimorfismos do gene <i>IL1β</i> , <i>IL1RN</i> e <i>IL8</i>	26
3.3 Extração de RNA.....	26
3.4 Expressão gênica por RT-PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR).....	27
3.5 Análise Estatística	29
3.5.1 Avaliação da expressão gênica	29
3.5.2 Estudo dos Polimorfismos Genéticos no sangue e encéfalo	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1 Amostras de Sangue	30
4.1.1 Expressão dos genes das interleucinas 1 β e 8.....	30
4.1.2 Genótipo da Interleucina 1 β	33
4.1.3 Genótipo da Interleucina 8.....	34
4.1.4 Expressão dos genes das Presenilinas 1 e 2	35
4.2 Amostras de encéfalo	38
4.2.1 Expressão dos genes das interleucinas 1 β e 8.....	38
4.2.2 Expressão dos genes das Presenilinas 1 e 2	41
4.2.3 Genótipo das Interleucinas 1 β e 8	44
5 CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS	46
ANEXO A - Comitê de ética em Pesquisa.	52
APENDICE A – Artigo científico publicado	53

1 INTRODUÇÃO

1.1 Componente genético e aspectos moleculares da doença de Alzheimer

A Doença de Alzheimer foi caracterizada primeiramente pelo patologista Alois Alzheimer em 1907 e trata-se de uma afecção neurodegenerativa irreversível e progressiva, de aparecimento insidioso que leva à diminuição da cognição, perda de memória e tendo como resultado a demência ^(1, 2). Em geral, a DA de acometimento tardio, de incidência após os 60 anos de idade, ocorre de forma esporádica (90-95% dos casos), enquanto que a DA de acometimento precoce, de incidência antes dos 50 anos, mostra a recorrência familiar.

Estudos genéticos envolvendo casos da Doença de Alzheimer (DA) familiar com início precoce associam-se a mutações em três genes principais: gene da proteína precursora da β -amilóide (A β PP), gene da presenilina 1 (*PSEN1*) e gene da presenilina 2 (*PSEN2*) ^(3, 4). A *PSEN1* e a *PSEN2* estão associadas com o aparecimento dos sintomas na fase pré-senil enquanto o peptídeo β -amilóide (A β) é associado ao início do desenvolvimento da DA ⁽⁵⁾.

Entretanto, casos esporádicos e familiares de DA com início tardio representam mais de 98% de todas as formas da doença e são potencialmente causadas pela interação de múltiplos genes associados a fatores ambientais. Nesses casos, o alelo E4 do gene da apolipoproteína E (*ApoE4*), que apresenta uma frequência duas a três vezes maior em indivíduos com DA, tem sido identificado como o principal fator de risco genético, podendo aumentar em até 50% o risco da DA ⁽⁶⁻⁸⁾.

Muitas mutações associadas a esses genes levam ao aumento da expressão do gene da proteína precursora da β -amilóide e o aparecimento precoce dos sintomas.

Não é possível excluir os fatores não genéticos (inflamatórios), que também podem influenciar a formação das placas senis e dos novos neurofibrilares. Dentre esses fatores, as citocinas são consideradas fundamentais, uma vez que, sua síntese endógena pode influenciar o acúmulo do peptídeo A β e a formação dos novos neurofibrilares no cérebro, levando à perda sináptica irreversível e conseqüentemente, alterações comportamentais ^(2, 9).

A etiologia da DA é complexa ⁽¹⁰⁾, mas há evidências de que mutações em pelo menos quatro diferentes locos genéticos podem conferir susceptibilidade inerente à

doença de Alzheimer: DA1 é causada pela mutação no gene da proteína precursora da β -amilóide localizada no cromossomo 21 ⁽¹¹⁾; DA2 é associada com o alelo *ApoE4* no cromossomo 19; DA3 é causada pela mutação no gene da presenilina 1 localizada no cromossomo 14 que codifica uma proteína transmembrana integral com pelo menos sete domínios transmembrana ⁽¹²⁾ e a DA4 é causada pela mutação do gene da presenilina 2 localizada no cromossomo 1 ^(13, 14).

É importante destacar que a associação entre a DA e a síndrome de Down levou a investigação e descoberta do primeiro gene associado à DA no cromossomo 21, cromossomo extra, envolvido na síndrome de Down. Indivíduos com a síndrome de Down apresentam envelhecimento prematuro e praticamente todos desenvolvem a doença de Alzheimer, clínica e neuropatologicamente, entre 40 e 50 anos de idade ^(15, 16).

O gene da proteína precursora da β -amilóide, localizado no cromossomo 21, foi o primeiro a ser identificado como sendo associado à DA, e tem sido considerado como responsável pela produção do peptídeo β -amilóide, que se deposita intensamente nas placas senis no encéfalo de afetados ^(9, 11, 14, 16-19).

Os genes ribossômicos se encontram localizados no interior do nucléolo durante a atividade transcricional e são transcritos pela RNA polimerase I, após o processamento, os transcritos estão entre os componentes estruturais e funcionais dos ribossomos e constituem 90-95% do RNA citoplasmático. A transcrição dos genes ribossômicos não é somente bastante eficiente, mas também altamente regulada nos eucariontes, uma vez que as células necessitam produzir milhares de novos ribossomos para a próxima geração, indispensáveis à síntese protéica das células filhas ⁽²⁰⁾.

Segundo trabalhos publicados pelo grupo foram observados, através de estudos realizados por técnicas citogenéticas e posteriormente técnicas moleculares, uma diminuição na atividade dos genes ribossômicos, em pacientes com DA ⁽²¹⁻²⁴⁾.

Os resultados obtidos nestes estudos sugerem uma possível alteração em processos como a transcrição, tradução ou maturação da fração maior de RNA, ou seja, degradação preferencial da subunidade maior de rRNA 28S.

1.2 Genes das Presenilinas, interleucinas e a Doença de Alzheimer

O encéfalo do paciente com DA é caracterizado principalmente por duas alterações neuropatológicas: as placas senis (ou amilóide) e os novos neurofibrilares. As placas senis são formadas pelo acúmulo, agregação e depósitos extracelulares do peptídeo β -amilóide ($A\beta$) no sistema nervoso central, que é derivado do processo de clivagem errônea de uma proteína transmembrana: proteína precursora da β -amilóide ($A\beta$ PP) ^(15, 19, 25, 26).

A $A\beta$ PP origina o peptídeo β -amilóide, através da ação proteolítica das enzimas β secretase e γ secretase. A γ secretase é formada por um complexo de proteínas composto pelas presenilina 1, presenilina 2 e nicastrina; assim mutações no sítio de clivagem da $A\beta$ PP, polimorfismos nos genes das enzimas secretases ou alterações no complexo de proteínas podem induzir a uma clivagem errônea da $A\beta$ PP aumentando a síntese do $A\beta_{42}$, que é insolúvel e principal componente das placas senis ⁽¹⁹⁾.

Já os novos neurofibrilares correspondem ao acúmulo intracelular de fibrilas denominadas pares de filamentos espiralados (PHF) ^(2, 15, 25).

A presenilina 1 parece interagir com uma série de proteínas que modulam a atividade da γ secretase ^(27, 28). Em um contexto patológico, 185 mutações missense em *PSEN1* e 13 mutações em *PSEN2* foram identificadas e consideradas associadas com a doença de Alzheimer familiar ([www.molgen.ua.ac.be / ADMutations](http://www.molgen.ua.ac.be/ADMutations)). Foi inicialmente sugerido que estas mutações levam a um ganho tóxico de função porque eles estão associados com um aumento relativo na produção de espécies $A\beta$ mais longas e hidrofóbicas, principalmente $A\beta_{1-42}$, que se acumulam e se agregam precocemente no curso da doença ^(29, 30). Caquevel et al., (2012) ⁽³¹⁾ e Park et al., (2012) ⁽³²⁾ sugeriram, que o estresse oxidante ativado pela sinalização extracelular, contribui para o aumento em β -secretase e, conseqüentemente a um aumento geração de β -secretase em células neuronais expressando *PSEN2* mutante.

As interleucinas são moléculas de peptídeos que mediam a interação entre as células do sistema imune com outros sistemas, entre eles o sistema endócrino. As mesmas são produzidas por uma variedade de células e seus efeitos biológicos se dão através da ligação em receptores específicos ⁽³³⁾.

O processo inflamatório parece contribuir para a DA. Citocinas e outras proteínas associadas à inflamação foram encontradas no encéfalo de pacientes com DA e não em indivíduos controle ⁽³⁴⁾. É amplamente aceito que a reação inflamatória crônica desempenha um importante papel na patogênese da doença de Alzheimer, e uma variedade de fatores inflamatórios, incluindo citocinas e quimiocinas, foram detectados em torno das placas senis e nos novos ^(35, 36).

Portanto alterações na expressão dos genes das Presenilinas 1 e 2 bem como, o aumento da expressão do gene *APP*, através da duplicação genômica ou mutações, e a expressão e os polimorfismos das interleucinas, podem estar associadas ao aparecimento e a evolução da DA, o que torna as Presenilinas, A β e as interleucinas fundamentais na etiologia da doença.

1.3 PCR em tempo real (qRT- PCR) e suas aplicações

A PCR em tempo real é descrita como uma extensão da técnica da PCR convencional, descoberta por Mullis em 1980, que permite o monitoramento e análise da amplificação, a cada ciclo da reação ^(37, 38).

Existem muitos métodos que mensuram a quantidade de material genético, entretanto o qRT-PCR apresenta os melhores resultados, com uma alta sensibilidade e especificidade, além de uma excelente reprodutibilidade ⁽³⁹⁾. Dentre todas as aplicações do qRT-PCR, podemos destacar a quantificação da expressão gênica (relativa ou absoluta), validação de plataformas de “microarray”, detecção e quantificação de microorganismos, identificação de polimorfismos e diagnósticos moleculares ⁽⁴⁰⁾.

Na Doença de Alzheimer, estudos recentes utilizando a técnica de PCR em Tempo Real apresentaram resultados controversos quanto à expressão gênica, em amostras de encéfalo e sangue, de pacientes com DA e controles ⁽⁴¹⁻⁴³⁾, tornando a expressão do gene da *APP*, γ e β secretases e presenilinas 1 e 2 candidatas a estarem associadas a etiologia da DA. Roher et al., (2009) ⁽¹⁴⁾ propuseram que a super expressão do gene da proteína precursora da β -amilóide, é o principal marco no início do desenvolvimento da DA.

Kumar et al., (2009) ⁽⁴⁴⁾ e Giliberto et al., (2009) ⁽⁴⁵⁾ destacaram o aumento da expressão do gene da *PSEN1* associado ao grande depósito de placas senis e acúmulo

do A β . Payão et al., (1998)⁽⁴⁶⁾ e Silva et al. (2000)⁽²³⁾ em artigos publicados pelo nosso grupo relataram uma diminuição da atividade e conseqüentemente uma menor expressão dos genes ribossomais em pacientes com DA sugerindo também sua relação com a etiologia da doença.

Em vista do exposto, a utilização da técnica da PCR em Tempo Real (qRT-PCR) para análise da expressão destes genes e associados aos polimorfismos, em amostras de encéfalo (3 regiões distintas) e sangue de pacientes com DA e controles torna-se uma proposta extremamente original, não existindo nenhum relato na literatura desta abordagem em conjunto, abrindo novas perspectivas no esclarecimento da etiologia da DA e podendo ser um marco para outros trabalhos envolvendo este assunto.

2 O B J E T I V O S

2.1. Objetivo geral

Caracterizar a expressão dos genes das Presenilinas 1 e 2, interleucinas 1 β e 8 e os polimorfismos dos genes das *IL1 β* , *IL8* e da *IL1RN* em amostras de sangue e encéfalo de pacientes com DA e controle.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Quantificar a expressão do mRNA dos genes das Presenilinas 1 e 2, e interleucinas 1 β e 8, analisando o número de cópias do transcrito do mRNA por meio da técnica de PCR em Tempo Real em amostras de encéfalo;

2.2.2 Quantificar a expressão dos mesmos genes mencionados em 2.2.1., porém em amostras de sangue periférico de pacientes com DA, controles idosos e jovens saudáveis.

2.2.3. Avaliar as frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos (rs16944) e (rs1143634) do gene *IL1 β* , *IL8* e (rs4073) da *IL1RN*, por meio da técnica de PCR – RFLP / VNTR em amostras de encéfalo de pacientes com DA e controle idoso;

2.2.4. Avaliar as frequências alélicas e genótípicas dos mesmos genes citados em 2.2.3, porém em amostras de sangue periférico de pacientes com DA e controles idosos e jovens saudáveis.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Casuística

3.1.1 Sangue periférico

Os grupos estudados foram compostos por: 82 amostras de pacientes com DA (média de idade: $74,5 \pm 8,52$; 56♂ e 26♀), 83 idosos sadios (média de idade: $71,73 \pm 8,95$; 55♂ e 28♀) e 82 jovens sadios (média de idade: $20,76 \pm 1,63$; 54♂ e 28♀).

Aproximadamente 4 mL de sangue total periférico foi obtido através de punção venosa com seringa e agulha estéril em anticoagulante EDTA e utilizados para extração de RNA total e DNA genômico.

Foram incluídos no presente projeto, somente pacientes que apresentarem um mínimo de 3 anos de evolução da doença de Alzheimer e caracterizados pelos CDRs (coeficiente de demência) (Morris, 1993) ⁽⁴⁷⁾.

Todos os pacientes com doença de Alzheimer foram selecionados no Ambulatório de Neurologia do Comportamento da UNIFESP/EPM, sob a supervisão do Prof. Dr. Paulo H. F. Bertolucci.

O critério diagnóstico utilizado para a caracterização da DA é o NINCDS-ADRDA (*National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's disease and Related Disorders Association*) ^(48, 49). Tal critério foi estabelecido com base no DSM-IV (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*), com adaptações para o diagnóstico PROVÁVEL de doença de Alzheimer.

Os outros dois grupos de indivíduos foram constituídos por idoso(a)s sadio(a)s com idades aproximadas à dos pacientes com DA, sem seqüela de Acidente Vascular Cerebral, sem depressão profunda e não alcoolista, foram avaliados pelo Mini Exame do Estado Mental e pela aplicação do Índice de Katz e de jovens sadio(a)s com idades variando entre 18 e 25 anos.

Os controles idosos foram selecionados no Ambulatório de Geriatria da FAMEMA e os jovens sadio(a)s foram os estudantes dos cursos de Medicina e Enfermagem da FAMEMA.

3.1.2 Encéfalo

Os grupos foram compostos por: 52 indivíduos, sendo 26 pacientes com DA (média de idade $82,14 \pm 6,28$; 12♀ / 14♂) e 26 idosos saudáveis (média de idade $75,34 \pm 8,34$; 16♀ / 10♂). Ressaltamos que, de cada encéfalo foi coletada uma amostra de cada uma das três regiões distintas, sendo duas primariamente afetadas na doença de Alzheimer (DA) (hipocampo e córtex entorrinal) e uma secundariamente afetada pela DA (córtex auditiva), totalizando 156 amostras coletadas.

Essas 3 áreas distintas foram obtidas do mesmo encéfalo de pacientes com DA e de idosos saudáveis, sem comprometimento neurológico, avaliados previamente.

Todos os pacientes com DA foram submetidos a uma triagem clínica rigorosa que permitiu o diagnóstico da DA, tanto pelo acompanhamento do paciente em vida, como por análise do encéfalo *post mortem*. A duração da doença nos pacientes foi de no mínimo 3 anos de evolução, por outro lado o grupo de idosos saudáveis não apresentava história de doença neurológica ou psiquiátrica.

No total, foram extraídos RNA de 150 amostras a partir das células cerebrais das 3 regiões, (Córtex Entorrinal, Córtex auditiva e Hipocampo) de ambos os grupos, para posterior análise, pois seis destas sofreram degradação no transporte.

Banco de encéfalo no Brasil (UNIFESP/EPM)

Foram obtidas 45 amostras de encéfalo de 15 indivíduos (7 pacientes com DA e 8 controles idosos) envolvendo 3 regiões (Córtex Entorrinal, Córtex auditiva e Hipocampo) do banco de encéfalo coordenado pelo Prof. Dr. João Villares, professor adjunto do Departamento de Psicobiologia da UNIFESP/EPM e que contou com o apoio da FAPESP para a estruturação deste.

Banco de encéfalo no Canadá (“The Douglas - Bell Canada Brain Bank – Montreal Quebec – Canadá”)

Foram obtidas 105 amostras de encéfalo de 35 indivíduos (19 pacientes com DA e 16 controles) envolvendo 3 regiões (Córtex Entorrinal, Córtex auditiva e Hipocampo).

O quadro de procedência e número amostral dos tecidos de encéfalo e sangue dos pacientes com DA e controles podem ser observados no **QUADRO 1**.

O presente projeto foi submetido e aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da USC – 04/15273-3 Prot. 110/04 (Universidade do Sagrado Coração), FAMEMA – 09/15857-9 Prot. 511/09 (Faculdade de Medicina de Marília) (anexo 1).

Quadro 1 - Procedência e o número amostral dos tecidos cerebral e sanguíneo, de controles e pacientes com DA, que foram utilizados no presente trabalho.

Tecido	Origem da amostra	Número amostral	Abordagem científica	Total amostral
Cérebro	<i>The Douglas - Bell Canada Brain Bank</i>	105 amostras de 3 áreas distintas (19 pacientes com DA e 16 controles)	Análise da expressão gênica dos genes das Presenilinas e Interleucinas	150 amostras
	UNIFESP (Banco de Cérebro /Departamento de Psicobiologia)	45 amostras de 3 áreas distintas (07 pacientes com DA e 08 controles)		
Sangue	UNIFESP (Disciplina de Neurologia do Comportamento)	82 pacientes com DA	Análise de polimorfismos e correlação com a expressão gênica	247 amostras
	FAMEMA (Disciplina de Genética Hemocentro de Marília/ Ambulatório de Geriatria/alunos de Graduação/)	83 idosos controles e 82 jovens controles		

3.2 Extração de DNA

As extrações de DNA das amostras de encéfalo foram realizadas conforme protocolo estabelecido pelo fabricante do *QIAamp DNA Mini Kit*[®] - 51304 (QIAGEN, Alemanha). Fragmentos das amostras de encéfalo foram submetidos ao tratamento com uma solução de lise celular, posteriormente o produto foi aplicado a uma coluna de troca iônica com alta afinidade por DNA para purificação e eluição.

Para extração de DNA de sangue total periférico obtido por meio de punção venosa, foi utilizado o *QIAamp DNA Blood Midi Kit*[®] - 51185 (QIAGEN, Alemanha), segundo instruções do fornecedor.

3.2.1 Análise dos polimorfismos do gene *IL1 β* , *IL1RN* e *IL8*

A caracterização dos genótipos dos genes *IL1 β* , *IL1RN* e *IL8*, foi realizada através da técnica de PCR – RFLP, que já se encontra padronizada no nosso laboratório, conforme descrita nos artigos científicos publicados previamente pelo nosso grupo ^(7, 50, 51).

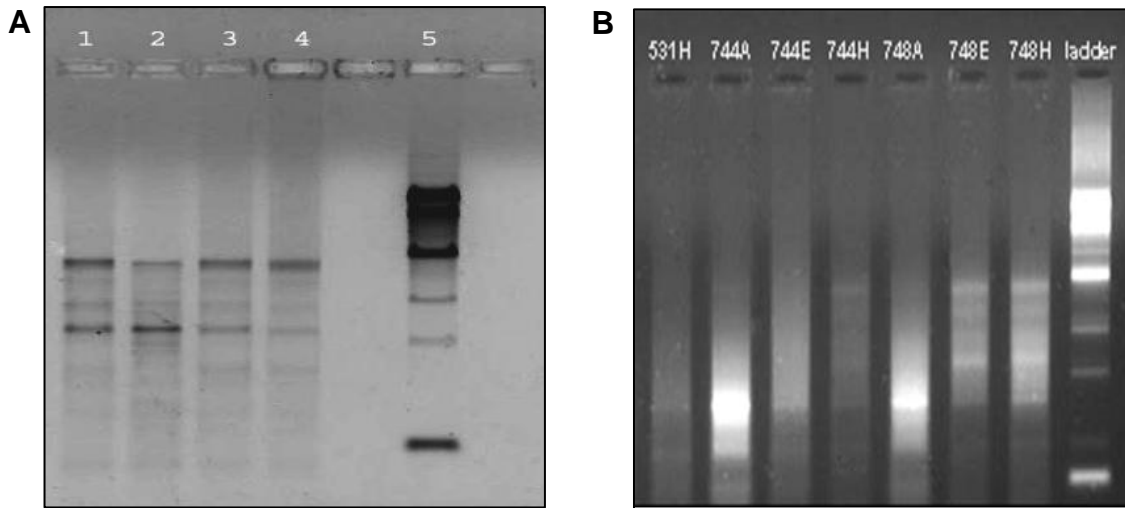
3.3 Extração de RNA

O tecido encefálico foi armazenado em uma solução para estabilização de RNA, *RNAlater*[®] *Tissue Collection* – AM7020 (Ambion, EUA), segundo instruções do fabricante e estocado a -20°C até o momento de sua utilização. Um fragmento do tecido (no máximo 100mg) foi pulverizado em gral/pistilo com nitrogênio líquido. Após esse procedimento, o RNA foi extraído utilizando o *RNeasy*[®] *Lipid Tissue Mini Kit* - 74804 (QIAGEN, Alemanha) segundo instruções do fabricante.

Para a extração de RNA total de sangue periférico foi utilizado *RiboPure*[™] *-Blood AM1928* (Ambion, EUA), segundo instruções do fornecedor.

A qualidade das amostras de RNA foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1%, e sua quantificação realizada utilizando o equipamento NanoDrop (ND-2000 Spectrophotometer) para posterior armazenamento a -80°C.

Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. A: Amostras de RNA extraídas de tecido encefálico e obtidas em colaboração com a Universidade Federal de São Paulo – SP. B: Amostras de RNA extraídas de tecido encefálico e obtidas em colaboração com *The Douglas - Bell Canada Brain Bank* – Montreal Quebec – Canadá.



3.4 Expressão gênica por RT-PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

Para a síntese do cDNA foi utilizado o High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies/Applied Biosystems) segundo instruções do fornecedor. As reações foram realizadas em um termociclador automático GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). O cDNA foi estocado a -80°C e utilizado quando necessário.

As amostras foram avaliadas no termociclador automático ABI Prism 7500 Fast Sequence Detection System (Life Technologies/Applied Biosystems) e processadas pelo sistema de detecção após um número variável de ciclos em fase exponencial. Os valores obtidos para todas as amostras foram normalizados pela razão obtida entre o gene de interesse e o gene de referência para cada tecido considerando a sua variabilidade de informação.

Para escolha dos genes de referência nas amostras de diferentes regiões do encéfalo, foram utilizados os genes *GAPDH*, *SDHA* e *B2M*, que segundo artigo de COULSON et al, (2008)⁽⁵²⁾, utilizando amostras de encéfalo de pacientes com DA, doença de Parkinson e demência por Corpúsculos de Lewy, destacaram que o fato de

um gene de referência ser estável para uma determinada doença, não significa que o será em uma outra, evidenciando assim a importância de utilizar mais de um gene de referência. Além destes foram utilizados os genes de referência *ISOC2* e *UBC* que foram posteriormente avaliados utilizando um banco de dados online chamado “TiGER Documentation” (Tissue-specific Gene Expression and Regulation), que é um banco de dados para a geração de informações completas sobre a regulação gênica específica de tecidos humanos.

No presente estudo, os iniciadores e sondas específicas para amplificação e detecção dos genes foram criteriosamente selecionados, a partir de uma relação (*selection guide*) de ensaios testados, validados e disponibilizados comercialmente como *TaqMan® Gene Expression Assay – inventoried* (Applied Biosystems), foram utilizados os ensaios: *PSEN1* (target; assay id: Hs00240518_m1), *PSEN2* (target; assay id: Hs00240982_m1), *IL8* (target; assay id: Hs99999034_m1), *IL1B* (target; assay id: Hs01555410_m1), *B2M* (endogenous control; assay id: Hs99999907_m1), *GAPDH* (endogenous control; assay id: Hs03929097_g1), *UBC* (endogenous control; Assay ID Hs00824723_m1) e *ISOC* (endogenous control; Assay ID Hs00226771_m1).

As reações foram realizadas utilizando o sistema *TaqMan®* (Life Technologies/ Applied Biosystems) com iniciadores e sondas específicas para a amplificação e detecção dos genes.

Para a quantificação relativa das moléculas de RNA nas amostras utilizamos os valores de Ct pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ⁽⁵³⁾. Em casos em que a eficiência da amplificação for superior a 90%, para cada amostra, o valor de ΔCt foi determinado subtraindo a média das triplicatas dos valores de Ct do gene de interesse, da média das triplicatas dos valores de Ct do gene de referência.

Posteriormente, para determinar o $\Delta\Delta Ct$, o valor de ΔCt de cada amostra foi subtraído pelo valor da média de ΔCt das amostras normais. A este último valor de $\Delta\Delta Ct$ foi adicionado a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e para cada amostra a quantidade de transcrito (N vezes > ou < que o normal) foi determinada pela comparação com amostras de tecido normal. Alternativamente, poderá ser utilizado o critério adotado por Pfaffl (2001) ⁽⁵⁴⁾.

3.5 Análise Estatística

3.5.1 Avaliação da expressão gênica

- Tecido Cerebral

- Análise estatística por comparações múltiplas das três regiões cerebrais

a) Os valores relativos de cada uma das três regiões cerebrais (hipocampo, córtex entorrinal e córtex auditiva) dos pacientes foram comparados aos dos controles, por meio de teste t bicaudal ou pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney, de acordo com a distribuição e natureza das variáveis.

b) Os valores relativos obtidos das três regiões investigadas dos casos e dos controles foram examinados em conjunto, preliminarmente, por Análise Multivariada para a identificação dos Componentes Principais. A partir desta identificação inicial, as regiões cerebrais de cada paciente foram comparadas entre si, bem como as regiões de cada controle, pelo teste paramétrico ANOVA ou pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, de acordo com a distribuição e natureza das variáveis.

c) Cálculo da correlação entre as regiões cerebrais de cada grupo de indivíduos pelos valores relativos de pacientes e dos controles, por meio do coeficiente de correlação de Pearson ou pelo coeficiente de Spearman, para dados não-paramétricos.

- Tecido sanguíneo

Os valores relativos de cada um dos três grupos de indivíduos avaliados (pacientes com DA, idosos saudáveis e jovens saudáveis) foram comparados, por meio de teste ANOVA para 2 ou mais grupos ou pelo teste t student. As variáveis dicotômicas foram avaliadas pelo teste quiquadrado de acordo com a distribuição e natureza dessas.

Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Todas as análises foram realizadas com o programa SPSS 20.0.

3.5.2 Estudo dos Polimorfismos Genéticos no sangue e encéfalo

a) O tamanho amostral referente ao número de indivíduos com DA e de controles foi calculado pela distribuição binomial, considerando-se a frequência dos alelos raros, cujos relatos da literatura e de amostra de trabalho de nosso grupo, variaram entre 0,30 a 0,40. Considerando-se estas frequências, o poder do teste igual a 0,99, nível α igual a 0,05 e teste bilateral, uma amostra de 80 indivíduos de cada grupo estará mais do que adequada ao estudo.

b) a distribuição dos genótipos foi testada em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg;

c) foi realizado estudo de associação caso-controle referente a cada polimorfismo, aos haplótipos, e ao efeito da interação entre os polimorfismos por meio de teste do Qui Quadrado, regressão logística binária e/ou teste de *Odds Ratio* (OR). No caso do polimorfismo da *IL-1 β* foram calculados o desequilíbrio de ligação e a associação dos haplótipos em relação à doença.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Amostras de Sangue

Nos tópicos de 4.1.1 a 4.1.4 são apresentados os resultados referentes a 247 amostras, todas coletadas e submetidas à extração de DNA e RNA, bem como a avaliação da expressão gênica e ao estudo de polimorfismos.

4.1.1 Expressão dos genes das interleucinas 1 β e 8

Todas as amostras de sangue foram analisadas estatisticamente para os genes das *IL1 β* e *IL-8* (figuras 2). Para o cálculo dos RQs de cada amostra, o grupo de idosos saudáveis foi selecionado como amostra referência.

Não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,875$) entre os três grupos estudados (pacientes com DA, idosos saudáveis e jovens saudáveis) na expressão do gene da interleucina 1 β (Gráfico 1).

Figura 2 - Plot contendo o resultado das curvas de amplificação dos genes das interleucinas A - 1β (gene referência *GAPDH*) e B - 8 (gene referência *B2M*) respectivamente.

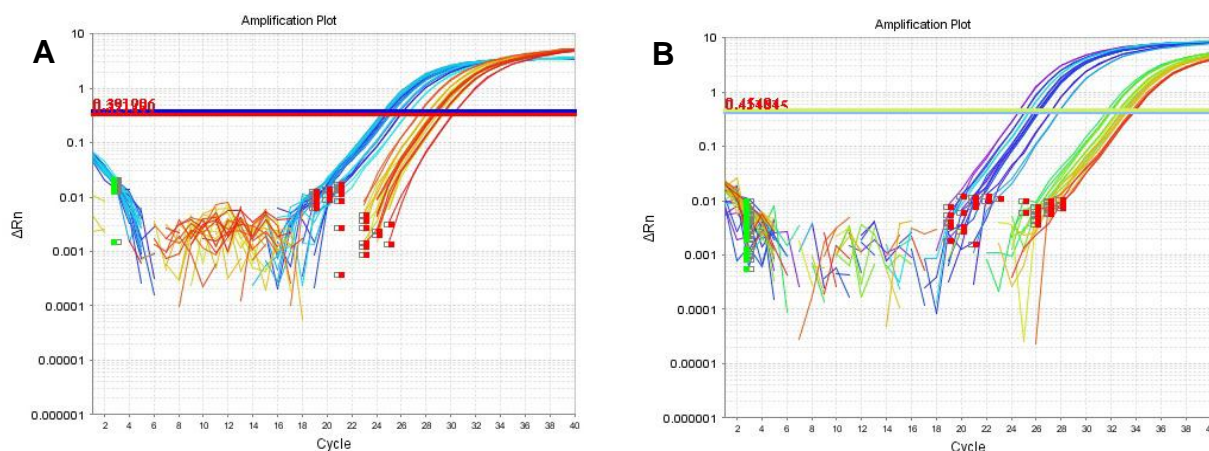
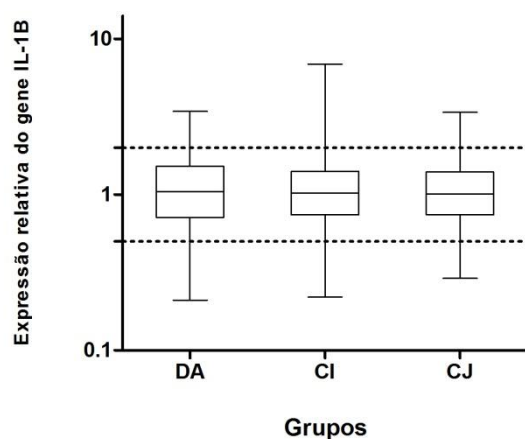


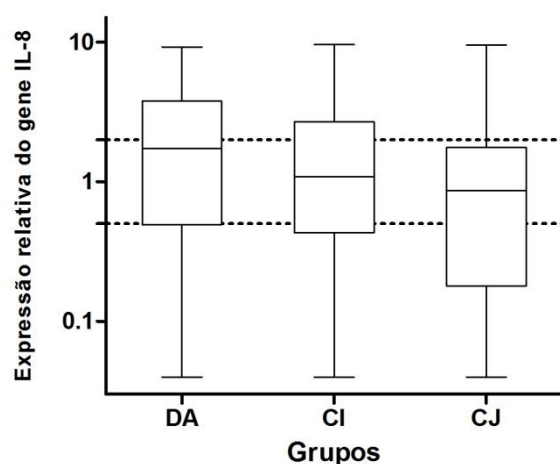
Gráfico 1 - Expressão relativa do gene da Interleucina 1β , em amostras de sangue, de pacientes com DA, Idosos Sadios e Jovens Sadios. DA: Pacientes com doença de Alzheimer; CI: idosos sadios; CJ: Jovens Sadios.



Em relação à análise da expressão da *IL-8*, verificamos uma diferença estatisticamente significativa entre os três grupos estudados ($p < 0,041$) (pacientes com DA, idosos sadios e jovens sadios), sendo, a expressão desse gene, maior em pacientes com DA seguido por idosos sadios e menor em jovens sadios (Gráfico 2). Pacientes com DA, idosos sadios e jovens sadios apresentaram no gene da *IL-8* "RQs" referentes a 2,48, 1,93 e 1,55, respectivamente, portanto o aumento da expressão

parece estar relacionado diretamente com a DA, embora, o envelhecimento também possa ser um fator determinante no aumento deste gene, porém, com menor intensidade.

Gráfico 2 - Expressão relativa do gene da Interleucina 8, em amostras de sangue, de pacientes com DA, Idosos Sadios e Jovens Sadios. DA: Pacientes com doença de Alzheimer; CI: idosos saudios; CJ: Jovens Sadios.



Algumas hipóteses têm sido propostas para a etiologia da doença de Alzheimer, dentre elas, a da neuroinflamação, resultante de diversos estudos que; em suma demonstram a agregação de células da microglia em depósitos amilóides no encéfalo de paciente com DA, e sugerem que a patogenese da DA esteja intimamente associada à ativação das células da microglia ⁽⁵⁵⁻⁵⁸⁾. De acordo com a hipótese neuroinflamatória, as células da microglia transformam os depósitos difusos de APP em placas senis compactas levando ao aparecimento da DA ⁽⁵⁹⁾.

A IL-1 β na circulação sanguínea pode induzir febre, anorexia, e hipotensão. No sistema nervoso central é um importante mediador da resposta imune podendo ativar o endotélio e potencializar a inflamação. Na DA, IL-1 β é expressa por meio da microglia ativada e parece induzir a síntese e aumentar o metabolismo da APP, favorecendo sua deposição e formação das placas senis ⁽⁵⁹⁾.

De acordo com os nossos resultados, não verificamos diferença estatisticamente significativa na expressão da IL-1 β . A análise da expressão do gene da *IL-1 β* em sangue de pacientes com DA é pouco explorada e controversa na literatura.

De Luigi et al., (2002) ⁽⁶⁰⁾ relataram um aumento da IL-1 β circulante em pacientes com DA, porém esse aumento não foi correlacionado com a expressão gênica. Os resultados obtidos por De Luigi et al., (2002) ⁽⁶⁰⁾ vão ao encontro aos resultados do estudo Licastro et al., (2000) ⁽⁶¹⁾ que também verificaram níveis elevados de IL-1 β no plasma de pacientes com DA e concluíram ainda que os altos níveis de IL-1 β no plasma de pacientes com DA não estão relacionados á ativação do sistema imune periférico e sugerem uma possível correlação com a inflamação neuronal.

Em relação à segunda interleucina estudada por nosso grupo, a IL-8, verificamos, um aumento estatisticamente significativo na expressão do gene da *IL-8* em pacientes com DA quando comparados aos idosos e jovens saudáveis. Esse resultado corrobora com os obtidos por Walker et al., (2001) ⁽⁶²⁾ que analisaram 104 genes relacionados com a APP em um “pool” de amostras de córtex cerebral e verificaram um aumento de 11,7 vezes na expressão do gene da IL-8.

Por outro lado, Kim et al. (2011) ⁽⁶³⁾ analisaram a concentração plasmática da IL-8 em 18 pacientes com DA, 21 pacientes com comprometimento cognitivo moderado e 20 controles e não encontraram diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados. Silvestroni et al., (2009) ⁽⁶⁴⁾ estudando córtex e cerebelo de pacientes com a Doença de Huntington verificaram um aumento na expressão dos genes da *IL-6* e *IL-8*, resultado corrobora com o nosso, porém em patologias distintas.

Podemos destacar que é de fundamental importância o entendimento do papel das interleucinas na patologia da DA e que o aumento da expressão da IL-8, mesmo em amostras de sangue, reforça a hipótese da neuroinflamação como possível etiologia da DA.

4.1.2 Genótipo da Interleucina 1 β

Os resultados referentes aos polimorfismos -31, -511 e receptor antagonista da *IL1 β* estão apresentados em forma de artigo publicado em 2012 (APENDICE A).

4.1.3 Genótipo da Interleucina 8

Nos resultados referentes à caracterização dos genótipos da *IL-8* (-251) (Figura 3: A e B) verificamos que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, entretanto, quando comparamos pacientes sem o alelo A (homozigoto TT) com os pacientes portadores do alelo A (homozigoto AA e heterozigoto TA) a análise estatística revelou uma diferença estatisticamente significativa na frequência do Alelo A com uma maior prevalência deste alelo em pacientes com DA.

Figura 3 - A) gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio para visualização de um produto da PCR de 349pb. Amostras de pacientes com DA, slots de 1 a 6; Controle negativo slot 7 e Marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen) slot 8. B) Gel de agarose 3%, corado com brometo de etídio contendo a caracterização dos genótipos pela técnica de RFLP, utilizando a enzima de restrição *MunI* (Fermentas). Slot 1 – alelo TT; slots 2, 3, 5 e 6 – alelo TA e slot 4 – alelo AA; slot 7 - Marcador de peso molecular de 25pb (Invitrogen).

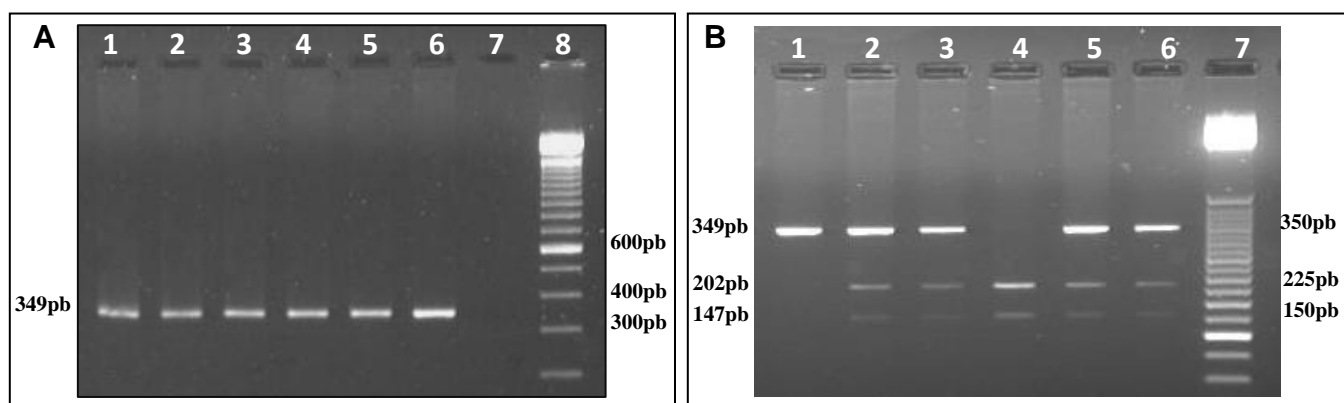


Tabela 1 - Distribuição dos alelos da Interleucina 8 em amostras de sangue de pacientes com doença de Alzheimer (DA), idosos saudáveis (CI) e jovens saudáveis (CJ).

Tabela 1:
Distribuição dos alelos:

ALELOS	DA	CI	CJ
A	83 (50%)	64(38,5%)	74(45%)
T	81 (49%)	102(61,5%)	90(55%)
TOTAL	164	166	164

Tabela 2 - Distribuição dos genótipos da Interleucina 8 em amostras de sangue de pacientes com doença de Alzheimer (DA), idosos saudáveis (CI) e jovens saudáveis (CJ).

Tabela 2:
Distribuição dos genótipos:

GENÓTIPOS	DA	CI	CJ
A/A	21 (25,6%)	16(19,3%)	15(18,3%)
T/T	20(24,4%)	35(42,2%)	23(23%)
T/A	41(50%)	32(38,5%)	44(53,7%)
TOTAL	82	83	82

4.1.4 Expressão dos genes das Presenilinas 1 e 2

Em relação à expressão dos genes das *PSEN1* e *PSEN2* (figura 4) verificamos uma diminuição estatisticamente significativa ($p=0,026^*$) nos níveis de expressão do

gene da *PSEN2* no sangue de pacientes com DA quando comparados a idosos saudáveis e jovens saudáveis, (Gráfico 3). É importante destacar que também analisamos a expressão de ambos os genes (*PSEN1* e *PSEN2*) associados ao sexo e encontramos uma diminuição estatisticamente significativa do gene da *PSEN2* apenas em pacientes do sexo masculino ($p=0,035^*$). Por outro lado, não houve diferença estatisticamente significativa na expressão dos genes das *PSEN1* e *PSEN2* nos pacientes do sexo feminino.

Figura 4 - Plot contendo o resultado das curvas de amplificação dos genes A - Presenilinas 1 (gene referência GAPDH) e B - Presenilinas 2 (gene referência B2M) respectivamente.

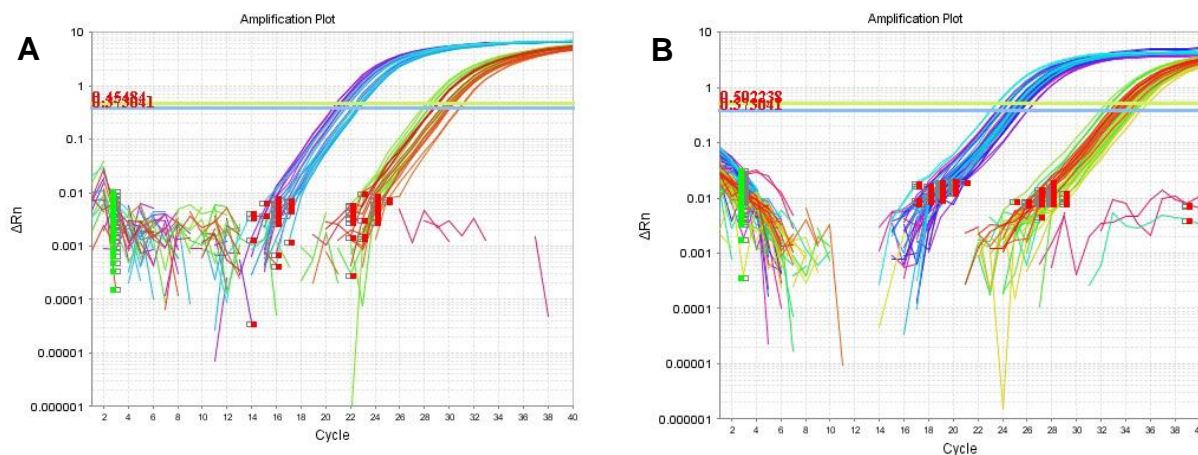
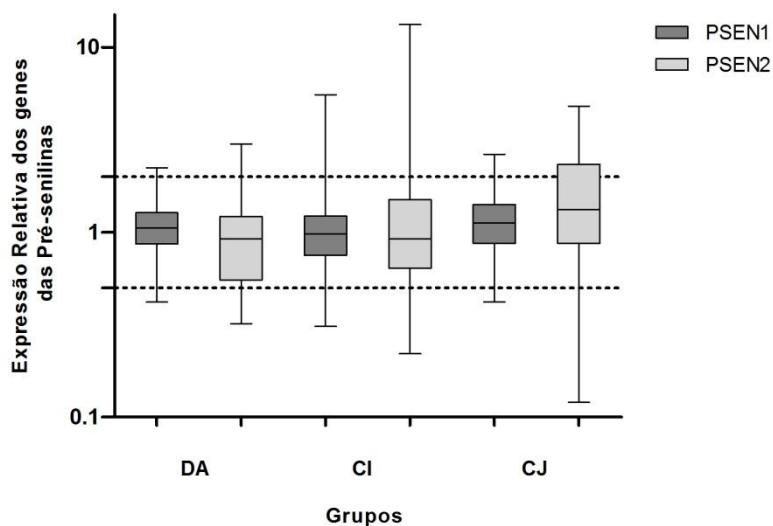


Gráfico 3: Expressão relativa dos genes das Presenilinas 1 e 2, em amostras de sangue, de pacientes com DA, Idosos Saudáveis e Jovens Saudáveis. DA: Pacientes com doença de Alzheimer; CI: idosos saudáveis; CJ: Jovens Saudáveis.



Mutações na proteína precursora da beta-amilóide, presenilina 1 e 2 podem estar relacionadas ao início precoce (< 60 anos) de pacientes com doença de Alzheimer familiar. Embora inicialmente consideradas como a única causa da DA de início precoce, mutações nas presenilinas 1 e 2 têm sido relatadas em várias famílias com início precoce e tardio da DA ⁽⁶⁵⁾.

Cruchaga et al., (2012) ⁽⁶⁶⁾ realizaram um “screening” de mutações em *APP*, *PSEN1* e *PSEN2*, utilizando um método de seqüenciamento de última geração e análises de bioinformática e observaram variantes raras de genes em 439 famílias com história de demência em quatro ou mais membros da família que contribuíram para o aumento de risco de desenvolvimento da DA.

Mutações nas Presenilinas associadas a DA alteram a relação Abeta42/Abeta40, uma tendência da Abeta se agregar na forma de espécies neurotóxicas, se esses agregados sejam deletérios poderá haver a formação de placas senis ou oligômeros solúveis. Assim essas mutações alteram o caráter bioquímico das gama-secretases e sua interação com o substrato da APP para a propensão ao acúmulo das placas senis no encéfalo de pacientes com DA ⁽⁶⁷⁾.

Aproximadamente 230 mutações descritas nos genes (*PSEN1/PSEN2/APP*) afetam uma via patogênica comum na síntese de APP e proteólise, o que conduzirá a uma produção excessiva de β amilóide nos casos de DA esporádica. Doença de Alzheimer familiar de aparecimento precoce tem algumas características distintas, incluindo história familiar positiva e uma variedade de sintomas não cognitivos e sinais neurológicos ⁽⁶⁸⁾.

Nossos resultados em relação à expressão diferencial das Presenilinas em sangue periférico de pacientes com DA podem corroborar com a premissa destacada anteriormente sobre a relação com o depósito das placas senis em pacientes com DA. No entanto, são poucos os trabalhos na literatura no que diz respeito a este contexto, daí a originalidade da nossa investigação e dos resultados obtidos.

4.2 Amostras de encéfalo

Nos tópicos de 4.2.1 a 4.2.3 são apresentados os resultados referentes a 150 amostras de encéfalo, todas coletadas e submetidas à extração de DNA e RNA bem como a avaliação da expressão gênica e ao estudo de polimorfismos.

Os “plots” representativos da análise da expressão gênica das Interleucinas 1 β e 8 e das Presenilinas 1 e 2 encontram-se inseridos nas figuras de 5 e 6 referente as amostras de encéfalo. Sendo que, os genes foram normalizados utilizando os genes *B2M*, *GAPDH*, *ISOC2* e *UBC* como genes endógenos e os cálculos dos “RQs” foram realizados utilizando as amostras de idosos sadios como referência.

4.2.1 Expressão dos genes das interleucinas 1 β e 8

Foi verificado um aumento estatisticamente significativo ($p=0,021^*$) na expressão do gene da *IL-8* (figura 5) em amostras de encéfalo de pacientes com DA quando comparados a idosos sadios, resultado observado quando a comparação foi realizada considerando todas das áreas simultaneamente (Gráfico 4). Em relação a *IL-1 β* (figura 8) não houve diferença estatisticamente significativa quando realizada a mesma análise.

Figura 5 - Plot contendo o resultado das curvas de amplificação dos genes das interleucinas A - 1 β (gene referencia *B2M*) e B - 8 (gene referencia *UBC*) respectivamente.

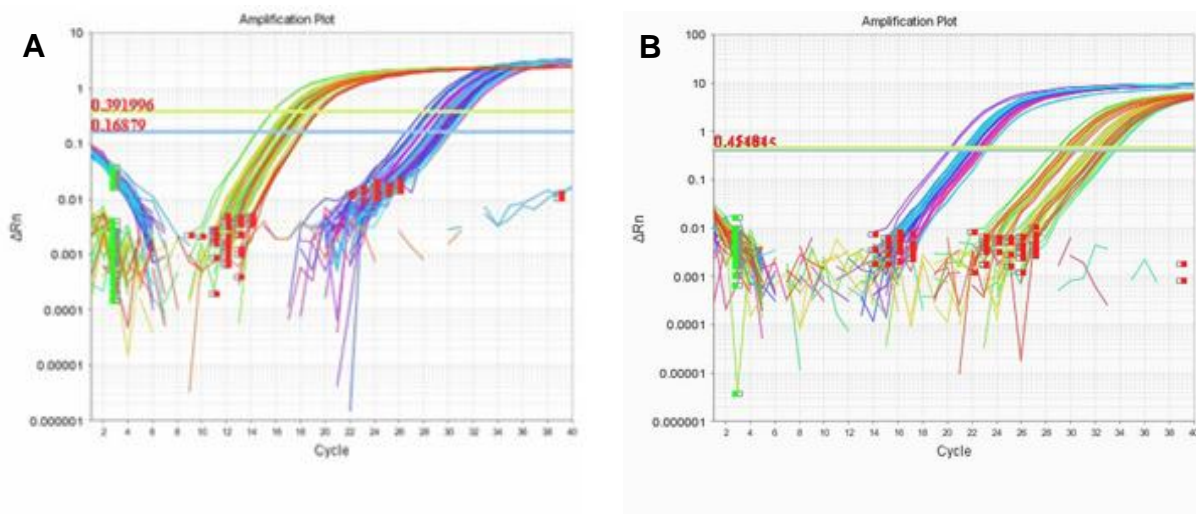


Gráfico 4 - Expressão relativa dos genes das Interleucinas 1 β , em tecido cerebral, de idosos saudáveis e pacientes com Doença de Alzheimer. Comparação dos valores de $2^{-\Delta\Delta CT}$ entre os grupos estudados.

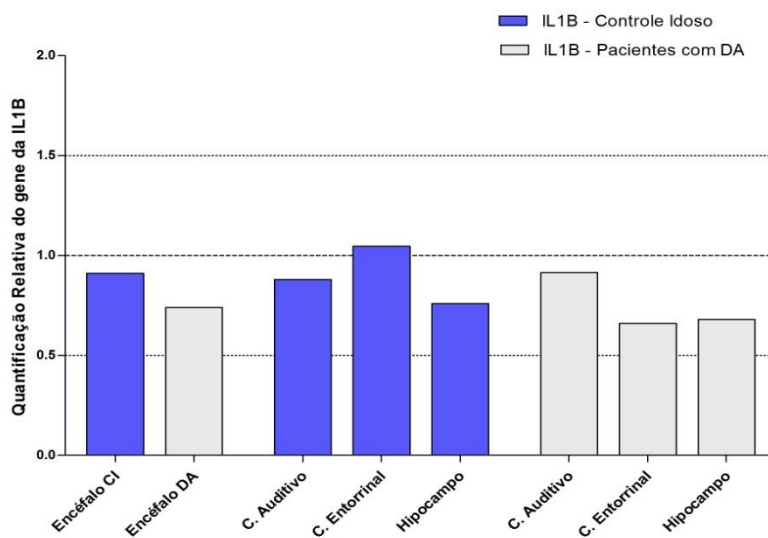
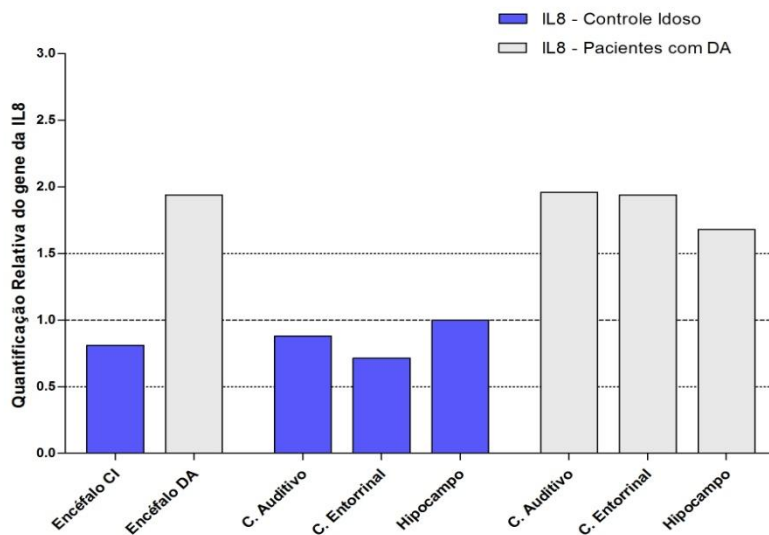


Gráfico 5 - Expressão relativa dos genes das Interleucinas 8, em amostras de encéfalo, de pacientes com DA. Comparação dos valores de $2^{-\Delta\Delta CT}$ entre os grupos estudados.



A análise estatística da expressão dos genes da *IL-1 β* e *IL-8*, de cada grupo separadamente, não revelou diferença significativa quando as três diferentes áreas do encéfalo (hipocampo, córtex entorrinal e córtex auditiva) foram comparadas entre si. A expressão da *IL-1 β* e *IL-8* se mostraram uniformemente distribuídas em diferentes áreas do encéfalo de pacientes com DA e idosos saudáveis (Gráfico 5 e 6).

A comparação entre as três áreas do encéfalo de pacientes com Alzheimer e idosos saudáveis não apresentou diferença estatisticamente significativa para os dois genes discutidos no presente tópico (*IL-1 β* e *IL-8*), entretanto, quando realizada a comparação entre as áreas individualmente, as regiões do córtex entorrinal e córtex auditivo apresentaram aumento estatisticamente significativo dos níveis de expressão do gene da *IL-8* em pacientes com Doença de Alzheimer ($p=0,036^*$ e $0,016^*$ respectivamente); por outro lado a região do hipocampo não apresentou diferença estatisticamente significativa entre pacientes com doença de Alzheimer e idosos saudáveis ($p=0,158$). Em relação à interleucina 1β , a análise entre as áreas individualmente não apresentaram diferença estatisticamente significativa.

Estudo da expressão gênica das *IL-1 β* e da *IL-8* em regiões do encéfalo de pacientes com DA e Idosos saudáveis são restritos na literatura, a dificuldade de obtenção das amostras parece ser o principal obstáculo enfrentado pelos pesquisadores.

Liu e colaboradores (2011), realizaram a implantação de *pellets* impregnados com *IL-1 β* em ratos e demonstraram que a *IL-1 β* induz a expressão da APP, *IL-1 α* e da ApoE e que sua expressão desregulada pode favorecer o desenvolvimento da DA. Em relação a *IL-1 β* , os resultados não apresentaram diferença estatisticamente significativa. Liano e colaboradores (2012) mensuraram a concentração de *IL-1 β* no CSF (Cerebral Spinal Fluid) e verificaram um aumento significativo desta interleucina do CSF, sugerindo uma possível relação entre a fase da DA e as concentrações de *IL-1 β* no CSF.

Em relação a *IL-8*, nossos resultados corroboram em parte com os de Walker et al. (2001) que verificaram um aumento da expressão da *IL-8* em amostras de córtex cerebral de pacientes com DA e com os de Silvestroni e colaboradores (2009) que estudando córtex e cerebelo de pacientes com a Doença de Huntington verificaram um aumento na expressão dos genes da *IL-6* e *IL-8*. O aumento da expressão da *IL-8*

parece estar ligado diretamente com a neuroinflamação e ativação das células cerebrais, porém sugerimos que em cada região cerebral tenha uma particularidade na expressão da IL-8 o que justifica os resultados em diferentes áreas do encéfalo do mesmo paciente.

Fica clara a importância das interleucinas da DA, porém, estudos adicionais futuros serão necessários para esclarecer o papel destas interleucinas e a forma de expressão nas diferentes áreas do encéfalo de pacientes com DA e idosos saudáveis.

4.2.2 Expressão dos genes das Presenilinas 1 e 2

Em relação à expressão dos genes da *PSEN1* e *PSEN2* (figura 6) no encéfalo de pacientes com DA e controles idosos, verificamos uma diminuição estatisticamente significativa ($p=0,046^*$) nos níveis de expressão da *PSEN2* em amostras de encéfalo de pacientes com DA quando comparados a idosos saudáveis, resultado observado quando a comparação foi realizada em todas regiões encefálicas simultaneamente (Gráfico 6).

Figura 6 - Plot contendo o resultado das curvas de amplificação dos genes A - Presenilinas 1 (gene referência *GAPDH*) e B - Presenilinas 2 (gene referência *ISOC*) respectivamente.

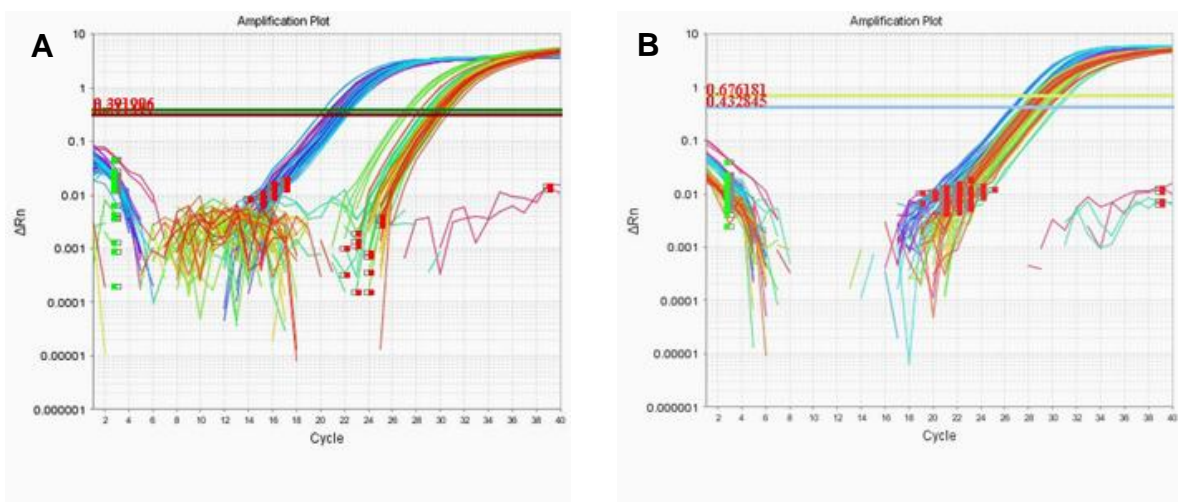


Gráfico 6 - Expressão relativa do gene da Presenilina 1 em amostras de encéfalo de idosos saudios e pacientes com Doença de Alzheimer. Comparação dos valores de $2^{-\Delta\Delta CT}$ entre os grupos estudados.

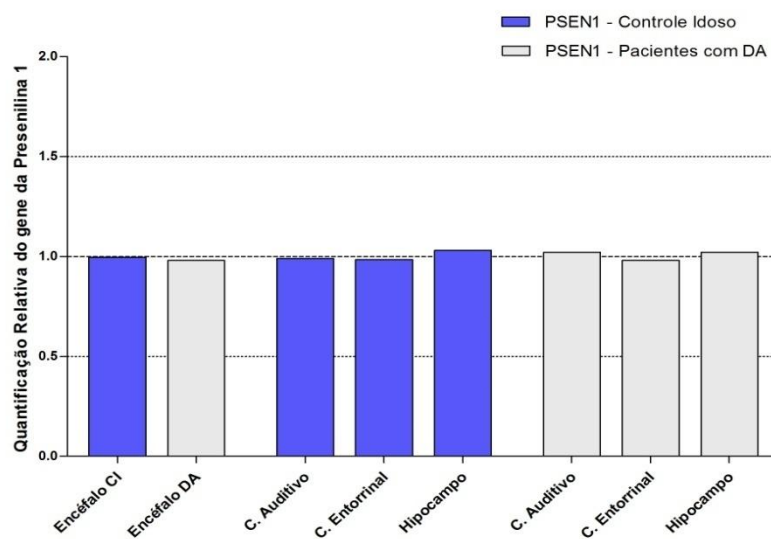
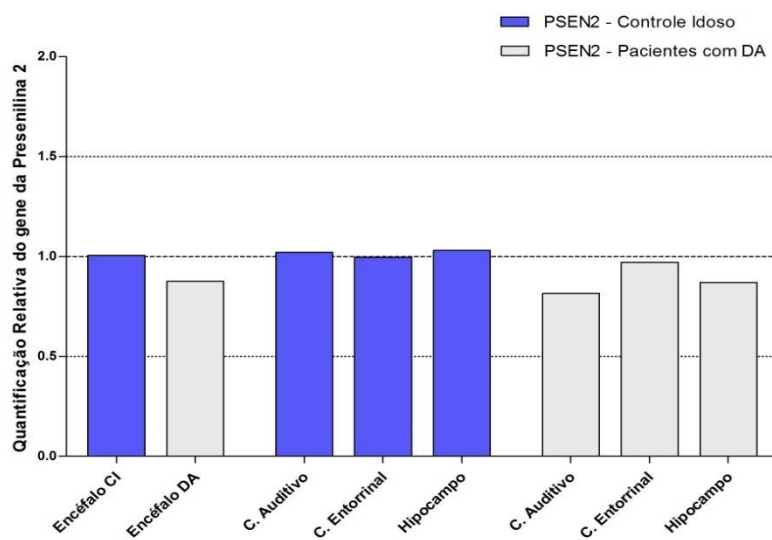


Gráfico 7 - Expressão relativa do gene da Presenilina 1 em amostras de encéfalo de idosos saudios e pacientes com Doença de Alzheimer. Comparação dos valores de $2^{-\Delta\Delta CT}$ entre os grupos estudados.



Quando a análise foi realizada por região encefálica, pacientes com DA apresentaram uma diminuição estatisticamente significativa ($p=0,016^*$) da expressão do gene da *PSEN2* em relação a idosos saudáveis, resultado observado apenas na região do córtex auditivo, área secundariamente afetada na DA (Gráfico 7).

A comparação entre as três áreas do encéfalo de idosos saudáveis não apresentou diferença estatisticamente significativa para os dois genes discutidos no presente tópico (*PSEN1* e *PSEN2*) (Gráficos 6 e 7), porém no grupo de pacientes com Alzheimer, quando realizada a comparação entre as áreas individualmente, a região do córtex auditivo apresentou níveis de expressão do gene da *PSEN2* diminuídos em relação ao córtex entorrinal, resultado não observado quando comparados com a região do hipocampo (Gráfico 7). Este resultado sugere uma distribuição desigual da expressão do gene da *PSEN2* entre as áreas do encéfalo de pacientes com DA. É importante destacar que o córtex entorrinal e o hipocampo são áreas primariamente afetadas pela DA e a alteração dos níveis de expressão podem estar associados diretamente ao estadiamento da DA.

Análise de transfecção de níveis de proteína *PSEN1* humana em cérebros de ratos transgênicos *PSEN1*, utilizando anticorpos específicos para C terminal revelou uma super-expressão de proteína *PSEN1* humana. Para confirmar a efeito de substituição da *PSEN1* humana exógena, foi avaliado e confirmado o nível de *PSEN2* endógena através de análise do nível de *PSEN2* usando anti-soro para reconhecer o fragmento C-terminal da *PSEN2* (*PSEN2*-CTF). Como esperado, o nível de *PSEN2*-CTF foi significativamente reduzido em cérebros de ratos transgênicos *PSEN1* quando comparado aos controles (Li et al., 2012).

A $A\beta$ PP origina o peptídeo β -amilóide, através da ação proteolítica das enzimas β secretase e γ secretase. A γ secretase é formada por um complexo de proteínas composto pelas presenilina 1, presenilina 2 e nicastrina; assim mutações no sítio de clivagem da $A\beta$ PP, polimorfismos nos genes das enzimas secretases ou alterações no complexo de proteínas podem induzir a uma clivagem errônea da $A\beta$ PP aumentando a síntese do $A\beta_{42}$, que é insolúvel e principal componente das placas senis (Chiang et al., 2008).

Kumar et al., (2009) e Giliberto et al., (2009) destacaram o aumento da expressão do gene da *PSEN1* associados ao grande depósito de placas senis e acúmulo do A β . Smith et al. (1996), Payão et al. (1998) e Silva et al. (2000) do nosso grupo relataram uma diminuição da atividade e conseqüentemente uma menor expressão dos genes ribossomais em pacientes com DA sugerindo também sua relação com a etiologia da DA.

4.2.3 Genótipo das Interleucinas 1 β e 8

O presente projeto também visa a divulgação dos resultados das análises estatísticas dos genótipos/alelos da Interleucina 8 e Interleucina 1 β porém, o pequeno número de amostras para a caracterização dos genótipos/alelos possa influenciar os resultados.

Não houve associação entre nenhum genótipo e/ou alelo dos genes da *IL-1 β* e *IL-8* com a Doença de Alzheimer.

5 CONCLUSÃO

1 - Não houve diferença estatisticamente significativa na expressão dos genes *PSEN1* e *IL1 β* em material de encéfalo de pacientes com DA e idosos saudáveis. Por outro lado, verificamos uma diminuição estatisticamente significativa nos níveis de expressão da *PSEN2* em pacientes com DA comparados a idosos saudáveis, quando consideradas todas as regiões encefálicas simultaneamente. Quando realizada a comparação entre as áreas individualmente, pacientes com DA apresentaram uma diminuição estatisticamente significativa em relação a idosos saudáveis na região do córtex auditivo e comparando apenas o grupo de pacientes com DA houve uma diminuição estatisticamente significativa no córtex auditivo em relação ao córtex entorrinal. Foi verificado ainda um aumento estatisticamente significativo na expressão do gene da *IL-8* em pacientes com DA em relação aos idosos saudáveis, comparando todas as áreas simultaneamente. Quando realizada a comparação entre as áreas individualmente, as regiões do córtex entorrinal e córtex auditivo apresentaram aumento estatisticamente significativo dos níveis de expressão do gene da *IL-8* em pacientes com Doença de Alzheimer.

2 - No sangue periférico não houve diferença estatisticamente significativa na expressão dos genes *PSEN1* e *IL1 β* nos grupos de idosos saudáveis, pacientes com DA e jovens saudáveis. Quando da análise da expressão do gene *PSEN2* foi observada uma diminuição estatisticamente significativa no grupo de pacientes com DA em relação aos idosos controles e jovens saudáveis, por outro lado os grupos de idosos e jovens saudáveis não diferiram significativamente. Em relação à análise da expressão da *IL-8*, verificamos uma diferença estatisticamente significativa entre os três grupos estudados, sendo, a expressão desse gene, maior em pacientes com DA seguido por idosos saudáveis e jovens saudáveis.

3 - Não houve associação entre nenhum genótipo e/ou alelo dos genes da *IL-1 β* e *IL-8* com a Doença de Alzheimer, porém, o pequeno número de amostras para a caracterização dos genótipos/alelos possa influenciar os resultados.

4 - Verificamos que não houve diferença estatisticamente significativa à caracterização dos genótipos da *IL-8*, entretanto, quando comparamos pacientes sem o alelo A com os pacientes portadores do alelo A e heterozigoto a análise estatística revelou uma diferença estatisticamente significativa na frequência do Alelo A com uma maior prevalência deste alelo em pacientes com DA. Quanto à caracterização dos genótipos da *IL-8*, encontramos uma maior frequência do Alelo A em pacientes com DA; já o estudo dos haplótipos dos genes da *IL1 β* e *IL1RN* revelaram um fator protetor ou de risco para a DA quando comparado com idosos saudáveis. Verificamos que a frequência dos genótipos dos genes das *IL1 β* e *IL1RN* não apresentaram diferença significativa, porém quando associados revelaram que o haplótipo -511C/-31T/2-repetições tinha um efeito protetor na DA, quando comparado a idosos saudáveis, enquanto que o haplótipo -511C/-31C/1-repetição e estaria associado a um fator de risco para DA. (Apendice A – artigo I)

REFERÊNCIAS

1. Harman D. Alzheimer's disease: A hypothesis on pathogenesis. *Journal of the American Aging Association*. 2000;23(3):147-61.
2. Cacquevel M, Lebourrier N, Cheenne S, Vivien D. Cytokines in neuroinflammation and Alzheimer's disease. *Current drug targets*. 2004;5(6):529-34.
3. Nelson O, Tu H, Lei T, Bentahir M, de Strooper B, Bezprozvanny I. Familial Alzheimer disease-linked mutations specifically disrupt Ca²⁺ leak function of presenilin 1. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(5):1230-9.
4. Giedraitis V, Hedlund M, Skoglund L, Blom E, Ingvast S, Brundin R, et al. New Alzheimer's disease locus on chromosome 8. *Journal of medical genetics*. 2006;43(12):931-5.
5. Uhrig M, Brechlin P, Jahn O, Knyazev Y, Weninger A, Busia L, et al. Upregulation of CRABP1 in human neuroblastoma cells overproducing the Alzheimer-typical Abeta42 reduces their differentiation potential. *BMC medicine*. 2008;6:38.
6. Lambert JC, Coyle N, Lendon C. The allelic modulation of apolipoprotein E expression by oestrogen: potential relevance for Alzheimer's disease. *Journal of medical genetics*. 2004;41(2):104-12.
7. Tavares WM, Speranca MA, de Labio RW, Peres CA, Okamoto IH, Bertolucci PH, et al. Apolipoprotein E4 allele and ribosomal genes in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2004;6(4):391-5; discussion 443-9.
8. Cheng D, Huang R, Lanham IS, Cathcart HM, Howard M, Corder EH, et al. Functional interaction between APOE4 and LDL receptor isoforms in Alzheimer's disease. *Journal of medical genetics*. 2005;42(2):129-31.
9. Vukic V, Callaghan D, Walker D, Lue LF, Liu QY, Couraud PO, et al. Expression of inflammatory genes induced by beta-amyloid peptides in human brain endothelial cells and in Alzheimer's brain is mediated by the JNK-AP1 signaling pathway. *Neurobiology of disease*. 2009;34(1):95-106.
10. Williamson J, Goldman J, Marder KS. Genetic aspects of Alzheimer disease. *The neurologist*. 2009;15(2):80-6.
11. St George-Hyslop PH, Tanzi RE, Polinsky RJ, Haines JL, Nee L, Watkins PC, et al. The genetic defect causing familial Alzheimer's disease maps on chromosome 21. *Science*. 1987;235(4791):885-90.
12. Nechiporuk A, Fain P, Kort E, Nee LE, Frommelt E, Polinsky RJ, et al. Linkage of familial Alzheimer disease to chromosome 14 in two large early-onset pedigrees: effects of marker allele frequencies on lod scores. *American journal of medical genetics*. 1993;48(1):63-6.

13. Gandy S. The role of cerebral amyloid beta accumulation in common forms of Alzheimer disease. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(5):1121-9.
14. Roher AE, Esh CL, Kokjohn TA, Castano EM, Van Vickle GD, Kalback WM, et al. Amyloid beta peptides in human plasma and tissues and their significance for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*. 2009;5(1):18-29.
15. Jones EL, Hanney M, Francis PT, Ballard CG. Amyloid beta concentrations in older people with Down syndrome and dementia. *Neuroscience letters*. 2009;451(2):162-4.
16. Smith M. Doença de Alzheimer. *Rev Bras Psiquiatria* 1999;21:5.
17. Sleegers K, Brouwers N, Gijssels I, Theuns J, Goossens D, Wauters J, et al. APP duplication is sufficient to cause early onset Alzheimer's dementia with cerebral amyloid angiopathy. *Brain : a journal of neurology*. 2006;129(Pt 11):2977-83.
18. Crossgrove JS, Smith EL, Zheng W. Macromolecules involved in production and metabolism of beta-amyloid at the brain barriers. *Brain research*. 2007;1138:187-95.
19. Chiang PK, Lam MA, Luo Y. The many faces of amyloid beta in Alzheimer's disease. *Current molecular medicine*. 2008;8(6):580-4.
20. Boisvert FM, van Koningsbruggen S, Navascues J, Lamond AI. The multifunctional nucleolus. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007;8(7):574-85.
21. Payao SL, Smith M, Kormann-Bortolotto MH, Toniolo J. Investigation of the nucleolar organizer regions in Alzheimer's disease. *Gerontology*. 1994;40(1):13-7.
22. Borsatto B, Smith M. Reduction of the activity of ribosomal genes with age in Down's syndrome. *Gerontology*. 1996;42(3):147-54.
23. Silva AM PS, Borsatto B, Bertolucci PH, Smith MA. Quantitative evaluation of the rRNA in Alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev*. 2000;120(1-3):8.
24. Payao SL, de Carvalho CV, da Silva ER, Lopes C, Markus RP, Winter LM, et al. Pinealectomy-associated decrease in ribosomal gene activity in rats. *Biogerontology*. 2001;2(2):105-8.
25. Culpán D, Prince JA, Matthews S, Palmer L, Hughes A, Love S, et al. Neither sequence variation in the IL-10 gene promoter nor presence of IL-10 protein in the cerebral cortex is associated with Alzheimer's disease. *Neuroscience letters*. 2006;408(2):141-5.
26. Zhou ZD, Chan CH, Ma QH, Xu XH, Xiao ZC, Tan EK. The roles of amyloid precursor protein (APP) in neurogenesis: Implications to pathogenesis and therapy of Alzheimer disease. *Cell adhesion & migration*. 2011;5(4):280-92.

27. He G, Luo W, Li P, Remmers C, Netzer WJ, Hendrick J, et al. Gamma-secretase activating protein is a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Nature*. 2010;467(7311):95-8.
28. Wakabayashi T, De Strooper B. Presenilins: members of the gamma-secretase quartets, but part-time soloists too. *Physiology (Bethesda)*. 2008;23:194-204.
29. Citron M, Westaway D, Xia W, Carlson G, Diehl T, Levesque G, et al. Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nature medicine*. 1997;3(1):67-72.
30. Delacourte A, Sergeant N, Champain D, Wattez A, Muraige CA, Lebert F, et al. Nonoverlapping but synergetic tau and APP pathologies in sporadic Alzheimer's disease. *Neurology*. 2002;59(3):398-407.
31. Cacquevel M, Aeschbach L, Houacine J, Fraering PC. Alzheimer's disease-linked mutations in presenilin-1 result in a drastic loss of activity in purified gamma-secretase complexes. *PloS one*. 2012;7(4):e35133.
32. Park MH, Choi DY, Jin HW, Yoo HS, Han JY, Oh KW, et al. Mutant presenilin 2 increases beta-secretase activity through reactive oxygen species-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2012;71(2):130-9.
33. El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA, et al. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature*. 2000;404(6776):398-402.
34. Farlow MR. Etiology and pathogenesis of Alzheimer's disease. *American journal of health-system pharmacy : AJHP : official journal of the American Society of Health-System Pharmacists*. 1998;55 Suppl 2:S5-10.
35. Galimberti D, Schoonenboom N, Scheltens P, Fenoglio C, Bouwman F, Venturelli E, et al. Intrathecal chemokine synthesis in mild cognitive impairment and Alzheimer disease. *Archives of neurology*. 2006;63(4):538-43.
36. Pomponi M, Bria P. Is Alzheimer's disease a synaptic disorder? *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2008;13(1):39-47.
37. Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. *Journal of molecular endocrinology*. 2005;34(3):597-601.
38. Lutfalla G, Uze G. Performing quantitative reverse-transcribed polymerase chain reaction experiments. *Methods in enzymology*. 2006;410:386-400.
39. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine*. 2006;27(2-3):95-125.

40. Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. *Advances in physiology education*. 2005;29(3):151-9.
41. Mufson EJ, Counts SE, Ginsberg SD. Gene expression profiles of cholinergic nucleus basalis neurons in Alzheimer's disease. *Neurochemical research*. 2002;27(10):1035-48.
42. Gutala RV, Reddy PH. The use of real-time PCR analysis in a gene expression study of Alzheimer's disease post-mortem brains. *Journal of neuroscience methods*. 2004;132(1):101-7.
43. Ginsberg SD, Che S, Counts SE, Mufson EJ. Single cell gene expression profiling in Alzheimer's disease. *NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. 2006;3(3):302-18.
44. Kumar VB, Franko M, Banks WA, Kasinadhuni P, Farr SA, Vyas K, et al. Increase in presenilin 1 (PS1) levels in senescence-accelerated mice (SAMP8) may indirectly impair memory by affecting amyloid precursor protein (APP) processing. *The Journal of experimental biology*. 2009;212(Pt 4):494-8.
45. Giliberto L, Borghi R, Piccini A, Mangerini R, Sorbi S, Cirmena G, et al. Mutant presenilin 1 increases the expression and activity of BACE1. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(14):9027-38.
46. Payao SL, Smith MA, Winter LM, Bertolucci PH. Ribosomal RNA in Alzheimer's disease and aging. *Mechanisms of ageing and development*. 1998;105(3):265-72.
47. Morris JC. The Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules. *Neurology*. 1993;43(11):2412-4.
48. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*. 1984;34(7):939-44.
49. Feldman HH, Jacova C, Robillard A, Garcia A, Chow T, Borrie M, et al. Diagnosis and treatment of dementia: 2. Diagnosis. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*. 2008;178(7):825-36.
50. Gatti LL, Burbano RR, de Assumpcao PP, Smith Mde A, Payao SL. Interleukin-1beta polymorphisms, Helicobacter pylori infection in individuals from Northern Brazil with gastric adenocarcinoma. *Clinical and experimental medicine*. 2004;4(2):93-8.
51. Vendramini AA, de Labio RW, Rasmussen LT, Minett T, Bertolucci PH, de Arruda Cardoso Smith M, et al. Interleukin-8 gene polymorphism -251T>A and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2007;12(3):221-2.

52. Coulson DT, Brockbank S, Quinn JG, Murphy S, Ravid R, Irvine GB, et al. Identification of valid reference genes for the normalization of RT qPCR gene expression data in human brain tissue. *BMC molecular biology*. 2008;9:46.
53. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
54. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*. 2001;29(9):e45.
55. Eikelenboom P, van Exel E, Hoozemans JJ, Veerhuis R, Rozemuller AJ, van Gool WA. Neuroinflammation - an early event in both the history and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neuro-degenerative diseases*. 2010;7(1-3):38-41.
56. Eikelenboom P, Veerhuis R, van Exel E, Hoozemans JJ, Rozemuller AJ, van Gool WA. The early involvement of the innate immunity in the pathogenesis of late-onset Alzheimer's disease: neuropathological, epidemiological and genetic evidence. *Current Alzheimer research*. 2011;8(2):142-50.
57. Heneka MT, O'Banion MK, Terwel D, Kummer MP. Neuroinflammatory processes in Alzheimer's disease. *J Neural Transm*. 2010;117(8):919-47.
58. Neniskyte U, Neher JJ, Brown GC. Neuronal death induced by nanomolar amyloid beta is mediated by primary phagocytosis of neurons by microglia. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(46):39904-13.
59. Wojtera M, Sobow T, Kloszewska I, Liberski PP, Brown DR, Sikorska B. Expression of immunohistochemical markers on microglia in Creutzfeldt-Jakob disease and Alzheimer's disease: morphometric study and review of the literature. *Folia neuropathologica / Association of Polish Neuropathologists and Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences*. 2012;50(1):74-84.
60. De Luigi A, Pizzimenti S, Quadri P, Lucca U, Tettamanti M, Fragiaco C, et al. Peripheral inflammatory response in Alzheimer's disease and multiinfarct dementia. *Neurobiology of disease*. 2002;11(2):308-14.
61. Licastro F, Pedrini S, Caputo L, Annoni G, Davis LJ, Ferri C, et al. Increased plasma levels of interleukin-1, interleukin-6 and alpha-1-antichymotrypsin in patients with Alzheimer's disease: peripheral inflammation or signals from the brain? *Journal of neuroimmunology*. 2000;103(1):97-102.
62. Walker DG, Lue LF, Beach TG. Gene expression profiling of amyloid beta peptide-stimulated human post-mortem brain microglia. *Neurobiology of aging*. 2001;22(6):957-66.

63. Kim SM, Song J, Kim S, Han C, Park MH, Koh Y, et al. Identification of peripheral inflammatory markers between normal control and Alzheimer's disease. *BMC neurology*. 2011;11:51.
64. Silvestroni A, Faull RL, Strand AD, Moller T. Distinct neuroinflammatory profile in post-mortem human Huntington's disease. *Neuroreport*. 2009;20(12):1098-103.
65. Brickell KL, Leverenz JB, Steinbart EJ, Rumbaugh M, Schellenberg GD, Nochlin D, et al. Clinicopathological concordance and discordance in three monozygotic twin pairs with familial Alzheimer's disease. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2007;78(10):1050-5.
66. Cruchaga C, Haller G, Chakraverty S, Mayo K, Vallania FL, Mitra RD, et al. Rare variants in APP, PSEN1 and PSEN2 increase risk for AD in late-onset Alzheimer's disease families. *PloS one*. 2012;7(2):e31039.
67. De Strooper B, Iwatsubo T, Wolfe MS. Presenilins and gamma-secretase: structure, function, and role in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2012;2(1):a006304.
68. Wu L, Rosa-Neto P, Hsiung GY, Sadovnick AD, Masellis M, Black SE, et al. Early-onset familial Alzheimer's disease (EOFAD). *The Canadian journal of neurological sciences Le journal canadien des sciences neurologiques*. 2012;39(4):436-45.

ANEXOS

ANEXO A - Comitê de ética em Pesquisa.

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos –
CEP/FAMEMA. Protocolo de estudo nº 064/99.

APENDICE A – Artigo científico publicado

Artigo científico publicado em periódico internacional de bom impacto. Sendo como produto diretamente relacionado a esse auxílio e trabalho de dissertação de mestrado.

- I. PAYAO, S. L. M.; Gonçalves, Gisela Moraes; **Labio, Roger Willian de**; Horiguchi, Lie ; Mizumoto, I ; Rasmussen, Lucas Trevisani ; Pinhel, Marcela Augusta de Souza; Souza, Dorotéia Rossi Silva ; Bechara, Marcelo Dib ; CHEN, Elizabeth Suchi ; Mazzotti, Diego Robles; Bertolucci, Paulo Henrique Ferreira; Smith, M. A.. Association of Interleukin 1 polymorphisms and haplotypes with Alzheimer s disease. Journal of Neuroimmunology, 247,59-62, 2012. (FI. 2.95).



FACULDADE DE MEDICINA DE MARÍLIA
Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo
Seres Humanos – CEP/FAMEMA

Marília, 08 de Setembro de 2009

Ilmo^(a) Sr.^(a)
Prof. Dr. Spencer Luiz M. Payão
Marília/SP

O Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Faculdade de Medicina de Marília, recebeu o protocolo de estudo nº 064/99, intitulado: "Avaliação Quantitativa do RNA e Caracterização do Protocolo dos Genes Ribossômicos na Doença de Alzheimer (DA)", foi considerado **APROVADO** em Reunião Ordinária – 28/06/1999, aceito de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, pode ser iniciado.

Este Protocolo foi **Alterado o Título e o nº 511/09**: Expressão dos Genes Ribossômicos e da Proteína Precursora da β -Amilóide em Amostras de Cérebro e Sangue de Pacientes com Doença de Alzheimer Utilizando a Técnica da PCR em Tempo Real", considerado **APROVADO "Ad Referendum"** – 08/09/2009.

Sendo só para o momento, reiteramos protestos de consideração e apreço.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Valdeir Fagundes de Queiroz
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa
Envolvendo Seres Humanos

