



**Análise molecular dos genes *PSEN1*, *COMT*, *BDNF*, *PLCG2* e *TREM2*,
relacionados à Doença de Alzheimer, em uma amostra de pacientes do Rio
de Janeiro**

Guilherme Proença da Fonseca

Orientadores: Prof. Dr. Pedro Hernán Cabello Acero

Prof. Dr. Jerson Laks

Duque de Caxias, 2019

Guilherme Proença da Fonseca

**Análise molecular dos genes *PSEN1*, *COMT*, *BDNF*, *PLCG2* e *TREM2*,
relacionados à Doença de Alzheimer, em uma amostra de pacientes do Rio
de Janeiro**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional na Universidade do Grande Rio – UNIGRANRIO como parte das exigências para a obtenção ao título de mestre em Ciências Biomédicas.

Orientadores: Prof. Dr. Pedro Hernán Cabello Acero

Prof. Dr. Jerson Laks

Duque de Caxias, 2019

CATALOGAÇÃO NA FONTE/BIBLIOTECA - UNIGRANRIO

F676a Fonseca, Guilherme Proença da.

Análise molecular dos genes PSEN1, COMT, BDNF, PLCG2 e TREM2, relacionados à doença de Alzheimer, em uma amostra de pacientes do Rio de Janeiro / Guilherme Proença da Fonseca. – 2019.

86 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado em Mestrado em Biomedicina Translacional) –
Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”, Escola de
Ciências da Saúde, 2019.

“Orientadores: Prof. Dr. Pedro Hernán Cabello Acero
Prof. Dr. Jerson Laks”.

Guilherme Proença da Fonseca

**Análise molecular dos genes *PSEN1*, *COMT*, *BDNF*, *PLCG2* e *TREM2*,
relacionados à Doença de Alzheimer, em uma amostra de pacientes do Rio
de Janeiro**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional na Universidade do Grande Rio – UNIGRANRIO como parte das exigências para a obtenção ao título de mestre em Ciências Biomédicas.

Aprovado em 14 de março de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a.: Mario Campos Júnior (FIOCRUZ)

Fundação Oswaldo Cruz/RJ

Prof. Dr^a.: Verônica Zembrzusk (FIOCRUZ)

Fundação Oswaldo Cruz/RJ

Prof^a. Dr^a.: Edson Jorge Lima Moreira (UNIGRANRIO)

Universidade do Grande Rio e Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional

Prof. Dr.: Pedro Hernán Cabello Acero (UNIGRANRIO/FIOCRUZ/BIOTRANS)

Universidade do Grande Rio, Fundação Oswaldo Cruz/RJ e Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional

Prof. Dr.: Jerson Laks (UFRJ/BIOTRANS)

Universidade Federal do Rio de Janeiro e Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional

*Aos meu pais, Nereida e Lúcio,
irmãos, namorada, familiares e amigos*

AGRADECIMENTOS

À Universidade do Grande Rio, especialmente ao Laboratório de Genética (LabGen), pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

À toda equipe do Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional pela dedicação e apoio recebido em todos os momentos.

Ao meu orientador Pedro Cabello pelo acolhimento, sua orientação, enorme paciência, ensinamentos, conselhos e por ser um grande exemplo e inspiração profissional.

Ao meu querido co-orientador Jerson Laks pela orientação, colaboração, conselhos, por ampliar meus conhecimentos e pela paciência.

À Danielle Voigt e Tamara Silva pelo ensino, apoio, amizade e toda paciência prestada nesses 2 anos.

À Dra. Verônica Zembruski, que mesmo antes da oportunidade de iniciar meu mestrado acreditou em meu potencial e me orientou como colaborador voluntário na FIOCRUZ. Agradeço imensamente por dedicar seu tempo e conhecimento para revisar e aprimorar minha dissertação.

À minha amada irmã, Ana Carolina Proença da Fonseca, por estar ao meu lado desde o início dessa caminhada; pela dedicação incansável, tempo, apoio, ensinamentos, ideias e por tornar esse projeto possível.

À todos os integrantes do LabGen pelo auxílio prestado, pelos momentos de alegria e de descontração.

Aos meus amados pais, Nereida e Lúcio, pelo apoio em todos os momentos, confiança na minha capacidade, paciência nas situações difíceis, por serem indispensáveis em minha vida, pelo amor incondicional e, acima de tudo, por acreditar em minha competência mesmo quando eu não acreditei. Obrigado por não medirem esforços para tornar este momento realidade.

À minha namorada, pelo incentivo, paciência, confiança, compreensão e por todo amor. Obrigado pela confiança e força para seguir em frente, todos os dias, sendo companheira e paciente o tempo todo.

Aos meus familiares e amigos que, mesmo de longe, sempre estiveram na torcida pelo meu sucesso nessa difícil caminhada.

“A vitalidade é demonstrada não apenas pela persistência,
mas pela capacidade de começar de novo.”

Francis Scott Key Fitzgerald

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Hipótese da cascata beta-amiloide que resulta nos eventos patogênicos que conduzem à DA. Mutações genéticas desencadeiam desequilíbrio na produção de A β 40 e A β 42, o que acarreta na agregação de A β 42, formando oligômeros tóxicos que promovem falhas sinápticas e ocasionam a morte de células neuronais, levando o paciente à demência 22

Figura 2. Representação esquemática do processamento de APP e acumulação de A β . O APP maduro (centro, dentro da caixa tracejada) é metabolizado por duas vias concorrentes: a via α -secretase que gera sAPP α e C83 (também conhecido como CTF α) (à esquerda); e a via β -secretase que gera sAPP β e C99 (à direita). O fragmento carboxil-terminal C99 é clivado pela γ -secretase para gerar A β e o domínio intracelular APP (AICD). O fragmento carboxil-terminal C83 também é clivado pela γ -secretase para os peptídeos P3 secretados (não mostrado). A β agrega em pequenos multímeros (dímeros, trímeros, e assim por diante), conhecidos como oligômeros. Os oligômeros parecem ser as neurotoxinas mais potentes, ao passo que a placa senil, em fase terminal, é relativamente inerte (Gandy S. 2005)..... 23

Figura 3. A hipótese A β sugere que os peptídeos A β participam na patogênese da DA. Os peptídeos, que são produzidos por neurônios e outras células cerebrais se agregam (formação de estruturas “ β -sheet”) em uma variedade de conjuntos de tóxicos, emaranhados neurofibrilares e placas neuríticas (Jucker & Walker 2011) 24

Figura 4. Representação esquemática dos quatro componentes do complexo γ -secretase. O complexo γ -secretase é composto de um componente catalítico, presenilina, e três cofatores, Nicastrina, APh-1 e PEN2. A presenilina é ativada biologicamente por endoproteólise que gera dois heterodímeros. Cada heterodímero apresenta o resíduo chave de aspartato (Gandy S. 2005) 26

Figura 5. Sequência de aminoácidos da *PSEN1* (círculos azuis) e da porção C-terminal da APP (círculos verdes) gerando A β . Mutações em *PSEN1* e APP são conhecidas por causar DA familiar e estão representadas em vermelho. Os sítios de clivagem β , α , γ , ϵ são indicados por pequenas tesouras. Os dois aminoácidos envolvidos na clivagem endoproteolítica da *PSEN1* são mostrados em azul escuro. Os dois resíduos de aspartato do sítio catalítico da *PSEN1* são realçados em amarelo. Junções de éxons também são mostrados. CTF, fragmento C-terminal de *PSEN1*; NTF, fragmento N-terminal de PSEN (Hardy & Selkoe 2002) 27

Figura 6. Estrutura do gene humano <i>COMT</i> e localização de oito SNP de marcação.....	29
Figura 7. Fluxograma do plano de trabalho.....	37
Figura 8. Gráfico de discriminação alélica do polimorfismo rs4680 do gene <i>COMT</i> . O eixo Y indica a intensidade de luz emitida pela fluorescência FAM, que está ligado a uma sonda que anela o alelo G. O eixo X indica o aumento da fluorescência VIC que está ligado a uma sonda que anela o alelo A. Os círculos azuis indicam indivíduos homozigotos para o alelo G; os círculos vermelhos indicam indivíduos homozigotos para o alelo A; os círculos verdes indicam indivíduos heterozigotos; o quadrado preto é o controle negativo da placa em questão.....	40
Figura 9. Gráfico de discriminação alélica do polimorfismo rs6265 do gene <i>BDNF</i> . O eixo Y indica a intensidade de luz emitida pela fluorescência FAM, que está ligado a uma sonda que anela o alelo T. O eixo X indica o aumento da fluorescência VIC que está ligado a uma sonda que anela o alelo C. Os círculos azuis indicam indivíduos homozigotos para o alelo T; os círculos vermelhos indicam indivíduos homozigotos para o alelo C; os círculos verdes indicam indivíduos heterozigotos; o quadrado preto é o controle negativo da placa em questão.....	40
Figura 10. Gráfico de discriminação alélica do polimorfismo rs72824905 do gene <i>PLCG2</i> . O eixo Y indica a intensidade de luz emitida pela fluorescência FAM, que está ligado a uma sonda que anela o alelo G. O eixo X indica o aumento da fluorescência VIC que está ligado a uma sonda que anela o alelo C. Os círculos vermelhos indicam indivíduos homozigotos para o alelo C; o quadrado verde indica indivíduos heterozigotos; o quadrado preto é o controle negativo da placa em questão.....	41
Figura 11. Gráfico de discriminação alélica do polimorfismo rs143332484 do gene <i>TREM2</i> . O eixo Y indica a intensidade de luz emitida pela fluorescência FAM, que está ligado a uma sonda que anela o alelo T. O eixo X indica o aumento da fluorescência VIC que está ligado a uma sonda que anela o alelo C. Os círculos vermelhos indicam indivíduos homozigotos para o alelo C; o círculo verde indica indivíduos heterozigotos; o quadrado preto é o controle negativo da placa em questão.....	41
Figura 12. Análise dos eletroferogramas na amostra de pacientes estudada.....	52

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Porcentagem das mutações encontradas em cada éxon do gene <i>PSEN1</i>	28
Gráfico 2. Frequência genotípica dos genes <i>PLCG2</i> e <i>TREM2</i> na amostra total.....	50
Gráfico 3. Frequência alélica dos genes <i>PLCG2</i> e <i>TREM2</i> na amostra total.....	50
Gráfico 4. Frequência genotípica do rs165932, no gene <i>PSEN1</i> , na amostra de pacientes.....	53
Gráfico 5. Frequência alélica do rs165932, no gene <i>PSEN1</i> , na amostra de pacientes.....	53

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1. <i>Clinical Dementia Rating</i> (CDR).....	35
Quadro 2. Desenhos das sondas utilizadas para genotipagem.....	39
Quadro 3. Desenhos dos <i>primers</i> utilizados para o sequenciamento de sanger.....	43

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Características gerais da amostra total.....	45
Tabela 2. Frequências genotípicas, alélicas e associação do polimorfismo rs4680 do gene <i>COMT</i> relacionados à doença de Alzheimer.....	47
Tabela 3. Frequências genotípicas, alélicas e associação do polimorfismo rs6265 do gene <i>BDNF</i> relacionados à doença de Alzheimer.....	48
Tabela 4. Genótipos e alelos das sondas rs72824905 (<i>PLCG2</i>) e rs143332484 (<i>TREM2</i>) na amostra total.....	49
Tabela 5. Genótipos e alelos do rs165932, no gene <i>PSEN1</i> , na amostra de pacientes.....	52
Tabela 6. Comparação da frequência do alelo mutado dos genes <i>PLCG2</i> e <i>TREM2</i> na população mundial e na amostra de pacientes estudada.....	57
Tabela 7. Comparação da frequência do alelo mutado do rs165932 na população mundial e na amostra de pacientes estudada.....	58

ABREVIACÕES

Aβ – β-amiloide

Aβ₄₀ – β-amiloide com 40 aa

A β_{42} – β -amiloide com 42 aa

Aa- Aminoácido

AlCD – domínio intracelular APP

APH1 - faringe anterior com defeito 1

ApoE – apolipoproteína E

APP – Proteína precursora de β -amiloide

AVC – acidente vascular cerebral

BACE1 - enzima 1 de clivagem do sítio-beta da APP

BDNF – fator neurotrófico derivado do cérebro

CDR - classificação clínica de demência

COMT – catecol-O-metiltransferase

CTF α – fragmento C-terminal α

CTF β – fragmento C-terminal β

NTF – fragmento N-terminal

CTF – fragmento C-Terminal

DA – Doença de Alzheimer

DAIP – Doença de Alzheimer de início precoce

DAIT – Doença de Alzheimer de início tardio

DNA - Ácido desoxirribonucleico

IVS – Sequência de variação intrônica

M – Molar

Met - metionina

µg - micrograma

µl - microlitro

mg - Miligrama

min - minuto

mL - Mililitro

NaOH - Hidróxido de sódio

pb - pares de base

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PLCG2 - Fosfolipase C gama 2

PSEN1 – Presinilina-1

PSEN2 – Presinilina-2

TREM2 - receptor desencadeante expresso em células mielóides 2

UNIGRANRIO - Universidade do Grande Rio

VAL - Valina

Sumário

RESUMO	17
ABSTRACT	18
1. INTRODUÇÃO	19
1.1. A Doença de Alzheimer.....	19
1.2 A hipótese β -amiloide	21
1.3. Proteína precursora β -amiloide (APP)	24
1.3.1 β -amiloides	25
1.3. Presenilinas.....	26
1.4. <i>Catechol-O-methyltransferase (COMT)</i>	28
1.5. <i>Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)</i>	30
1.6. Phospholipase C- γ 2 (<i>PLCG2</i>)	31
1.7. Triggering receptor expressed on myeloid cells (<i>TREM2</i>).....	31
2. JUSTIFICATIVA.....	33
3. OBJETIVOS.....	34
3.1. Objetivo principal	34
3.2. Objetivos secundários	34
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1. Amostras.....	35
4.1.1 Critérios de inclusão e exclusão	35
4.2. Métodos	37
4.2.1 Coleta de sangue	38
4.2.2 Extração do DNA.....	38
4.2.3 PCR em tempo real.....	38
4.2.3.1 Curvas de Padronização	39
4.2.4 Sequenciamento	42
4.3. Análise Estatística	43
5 RESULTADOS.....	45
5.1 Amostras.....	45
5.2 Gene <i>COMT</i>	46
5.3 Gene <i>BDNF</i>	47
5.4 Gene <i>PLCG2</i> e <i>TREM2</i>	48
5.5 Sequenciamento de Sanger	Erro! Indicador não definido.
6 DISCUSSÃO	54

6.1	Gene COMT	54
6.2	Gene BDNF	55
6.3	Genes PLCG2 e TREM2	56
6.4	Gene PSEN1	57
7	CONCLUSÃO	59
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
	ANEXO A	74
	ANEXO B	75
	ANEXO C	76
	ANEXO D	77

RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é a doença causadora de demência mais comum no mundo. Estima-se que cerca de 46,8 milhões de pessoas são portadoras, e projeções mostram que em 2050 o número de pacientes será triplicado. Clinicamente, ocorre uma neurodegeneração que leva a perdas graves de memória, funções cognitivas e distúrbios comportamentais. A DA pode ser classificada em doença de Alzheimer de início tardio (DAIT) e doença de Alzheimer de início precoce (DAIP), dependendo da faixa etária do aparecimento da patologia. Diversas inserções, deleções e mutações são descobertas a cada dia em genes candidatos influenciando na produção de β -amiloide com maior comprimento. Este polipeptídeo de peso molecular elevado permite uma oligomerização, que impede uma proliferação das sinapses nervosas, acarretando na morte dos neurônios e consequentemente um progresso da DA. Estudos mostram que mutações nos genes *APP*, *PSEN1* e *PSEN2* são responsáveis pelo aparecimento desta patologia. Ademais, novos estudos sugerem que genes como *COMT*, *BDNF*, *PLCG2* e *TREM2*, que atuam através de diferentes vias metabólicas, influenciam a idade do aparecimento da DA. O presente estudo tem como objetivo identificar mutações nos genes *PSEN1*, *COMT*, *BDNF*, *PLCG2* e *TREM2*, e investigar uma sugestão para o surgimento e agravamento da doença. Neste estudo, recrutamos 332 indivíduos acima de 55 anos, atendidos no Instituto de Psiquiatria da Universidade Federal do Rio de Janeiro e pelo Programa de Assistência Integrada da Saúde do Idoso de Duque de Caxias, e em todos foi aplicado o CDR (Clínical Demência Rating). A genotipagem dos polimorfismos estudados foi realizada através da técnica de PCR em Tempo Real. Na análise genotípica realizada para o polimorfismo rs4680 do gene *COMT*, os resultados mostraram um aumento do número de homozigotos mutados (AA) nos pacientes quando comparados aos controles ($p=0,013$). Análises posteriores sugerem que este polimorfismo está associado ao DA através do modelo recessivo. A análise alélica também foi aplicada e observamos que o alelo mutado (A) é um fator de risco para o desenvolvimento da DA ($p=0,013$). No polimorfismo rs6265, do gene *BDNF*, não foi observada significância estatística nas análises realizadas. Os polimorfismos dos genes *PLCG2* (rs72824905) e *TREM2* (rs143332484) se mostraram com baixa frequência, impossibilitando uma análise estatística. Contudo, a frequência genotípica e alélica foi avaliada em nossa amostra total. No rs72824905, do gene *PLCG2* observamos uma frequência genotípica de 99% para homozigotos selvagens, 1% para heterozigotos e 0% para homozigotos mutados, enquanto a frequência do alelo mutado foi de 0,5%. O rs143332484, do gene *TREM2*, possui uma frequência genotípica de 99,3% para homozigotos selvagens, 0,7% para heterozigotos e 0% para homozigotos mutados, sendo que a frequência do alelo mutado foi de 0,35%. Em nossa amostra de pacientes o gene *PSEN1* não apresentou nenhuma mutação em sua região codificante, mas pudemos observar o polimorfismo rs165932 em seu íntron 7-8. O rs165932, do gene *PSEN1*, apresentou uma frequência genotípica de 42,65% para homozigotos selvagens, 52,94% para heterozigotos e 4,41% para homozigotos mutados, sendo que a frequência do alelo mutado observada foi de 30,88%. Em nosso estudo demonstramos uma associação do gene *COMT* com a Doença de Alzheimer na amostra estudada, todavia outros estudos são necessários para uma melhor compreensão desta doença e sua relação genótipo-fenótipo na população brasileira.

Palavras-chave: Neurodegeneração, Alzheimer, PCR em Tempo Real, Polimorfismos, Mutações, Genes, Sequenciamento, *COMT*, *BDNF*, *PLCG2*, *TREM2*, *PSEN1*.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegeneration disorder in the world. It is estimated that about 46.8 million people are carriers, and projections show that by 2050 the number of patients will be tripled. Clinically there is neurodegeneration which lead to memory loss, cognitive functions and behavioral disorders. AD can be classified as late-onset Alzheimer's disease (LOAD) and early-onset Alzheimer's disease (EOAD), depending on the age range of the onset of the disorder. Several insertions, deletions and mutations are found out each day in candidate genes and influence on the production of β -amyloid with longer length. This high molecular weight polypeptide allows oligomerization, which prevents a proliferation of nerve synapses, leading to the death of neurons and consequently a progression of AD. Studies show that mutations in the genes *APP*, *PSEN1* and *PSEN2* are the main responsible for the appearance of this pathology. In addition, new studies suggest that genes such as *COMT*, *BDNF*, *PLCG2* and *TREM2*, which act through different metabolic pathways, influence the age of onset of DA. Thus, the present study aims to identify mutations in the genes *PSEN1*, *COMT*, *BDNF*, *PLCG2* and *TREM2*, and to investigate a suggestion for the appearance and aggravation of the disease. In this study, a total of 332 patients over 55 years of age were enrolled in the Institute of Psychiatry of the Federal University of Rio de Janeiro and the Integrated Health Care Program for the Elderly in Duque de Caxias, and in all of them applied the CDR (Clinical Dementia Rating). The genotyping of the polymorphisms studied was produced using the Real Time PCR technique. In the genotypic analysis performed for the rs4680 polymorphism of the *COMT* gene, the results showed an increase of mutated homozygotes (AA) in the patients when compared to the controls ($p = 0.013$). Further analyzes suggest that this polymorphism is associated with AD through the recessive model. An allelic analysis was also applied and we observed that the mutated allele (A) is a risk factor for the development of DA ($p=0,013$). In the rs6265 polymorphism, on the *BDNF* gene, no statistical significance was observed in the analyzes performed. The *PLCG2* genes (rs72824905) and *TREM2* (rs143332484) showed low frequency mutations, making a statistical analysis impossible. However, the genotypic and allelic frequency was evaluated in our total sample. In rs72824905, the *PLCG2* gene observed a genotypic frequency of 99% for wild homozygotes, 1% for heterozygotes and 0% for mutated homozygotes, while the frequency of the mutated allele was 0.5%. The rs143332484, of the *TREM2* gene, has a genotype frequency of 99.3% for wild homozygotes, 0.7% for heterozygotes and 0% for mutated homozygotes, and the frequency of the mutated allele was 0.35%. In our sample of patients the *PSEN1* gene did not present any mutation in its coding region, but we could observe the rs165932 polymorphism in its intron 7-8. The rs165932 of the *PSEN1* gene showed a genotypic frequency of 42.65% for wild homozygotes, 52.94% for heterozygotes and 4.41% for mutated homozygotes, and the frequency of the mutated allele observed was 30.88%. In our study, we demonstrated an association between the *COMT* gene and Alzheimer's disease in the studied sample, but other studies are necessary to better understand this disease and its genotype-phenotype relationship in the Brazilian population.

Keywords: Neurodegeneration, Alzheimer's, Real-time PCR, Polymorphisms, Mutations, Genes, Sequencing, *COMT*, *BDNF*, *PLCG2*, *TREM2*, *PSEN1*.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Doença de Alzheimer

A Doença de Alzheimer (DA) é uma patologia resultante de uma neurodegeneração progressiva do cérebro, sendo a principal forma de demência registrada. Em 2018, a organização World Alzheimer Report apontou que naquele ano 50 milhões de pessoas apresentavam a demência no mundo. Hoje, a cada três segundos um novo relato é registrado, estimando-se que em 2035 o mundo terá 81 milhões de casos e em 2050 alcançará mais de 152 milhões de pessoas (World Alzheimer Report, 2018). O rápido e contínuo processo de envelhecimento da população leva a um crescimento contínuo dos gastos com medicamentos e tratamentos que combatem a DA no Brasil (Brandão *et al.*, 2011; Aprahamian *et al.*, 2009). No Brasil ainda não é claro o impacto econômico causado pela DA, pois o tratamento oferecido pelo Sistema Único de Saúde (SUS) não possui dados específicos para esta doença, abordando apenas demência de forma genérica. Contudo, todo o mundo vem sofrendo com o aumento progressivo do custo da doença e países como Reino Unido, Canadá, Austrália e EUA têm gastos estimados de £18 bilhões, U\$15 bilhões, U\$6,6 milhões e U\$172 bilhões, respectivamente (Wimo *et al.*, 2006; Thies *et al.*, 2013).

A DA pode ser classificada em doença de alzheimer de início tardio (DAIT) e doença de alzheimer de início precoce (DAIP) dependendo da faixa etária do aparecimento da patologia. A DAIT acomete principalmente indivíduos com idade superior a 65 anos, enquanto que na DAIP os pacientes desenvolvem os sintomas com menos de 65 anos, e casos raros são relatados em pessoas com cerca de 40 anos (Hassanina *et al.*, 2014; Tiedt *et al.*, 2013). A DAIP é a forma mais rara, sendo uma doença genética com padrão de herança autossômica e é encontrada em 2-5% de todos os casos de pacientes com DA (Puglielli *et al.*, 2003).

Os pacientes com DA têm uma perda neuronal e sináptica nas regiões responsáveis pelas funções cognitivas, já na fase inicial da doença. As manifestações clínicas da DA são geralmente observadas apenas após anos da instalação de processos neuropatológicos. A morte de neurônios é ocasionada pelo acúmulo de monômeros de β -amiloides ($A\beta$) formando oligômeros no cérebro. Análises histológicas mostram que os oligômeros se apresentam neurotóxicos e se aglutinam ao redor dos neurônios, induzindo-os a uma morte celular. Alguns indivíduos apresentam uma expansão na taxa de $A\beta$ de cadeia mais longa ($A\beta_{42}$) e/ou retração

de A β de menor comprimento (A β_{40}) proporcionando um aumento no número de depósitos de A β no cérebro humano, desencadeando uma série de complicações que foram nomeadas como “a hipótese da cascata β -amiloide”. Dados de biopsia do cérebro humano, em estágio avançado da doença, mostram a formação de placas senis compostas principalmente por A β_{42} , proteínas Tau hiperfosforiladas e células neuronais mortas. Outra característica neurotóxica desencadeada pelo aumento na taxa de A β_{42} /A β_{40} é a hiperfosforilação das proteínas Tau. Essas proteínas, na sua atividade, normal auxiliam na manutenção da integridade dos neurônios e promovem a montagem e a estabilidade dos microtúbulos (citoesqueleto). No entanto, em pacientes com DA, estas se acumulam em um estado anormal, desintegrando o citoesqueleto e formando um emaranhado neurofibrilar nas membranas celulares, do complexo de Golgi e do retículo endoplasmático de células neuronais. A formação desse emaranhado ocasiona a perda da forma e função do neurônio, levando à morte da célula (Bruno *et al.*, 2005).

A degeneração dos neurônios ocasiona um quadro clínico inicial no qual o paciente exibe uma perda progressiva de memória recente. O avanço da doença acarreta a deterioração das funções cognitivas, distúrbios de personalidade e transtornos da linguagem. Em estágios avançados, observa-se a perda de memórias antigas, da autonomia motora por completo e finalmente a necessidade de cuidados médicos em tempo integral. A maioria dos fatores etiológicos da DA são desconhecidos. No entanto, há evidências de que fatores de risco, como vascular, psicossocial, genético e até mesmo ambiental têm um papel importante no desenvolvimento desta demência. Diferentemente da DAIT, a qual apresenta a maioria dos fatores etiológicos desconhecidos, a DAIP apresenta um componente genético de risco. Através dos anos, diversos genes foram identificados como susceptíveis ao desenvolvimento da DAIT, entretanto três genes são descritos como causadores da DAIP. Mutações nos genes *APP*, *PSEN1* e *PSEN2* estão associadas com aproximadamente 40% dos casos de DAIP, sendo observado um padrão de herança autossômica dominante entre 30 a 40% destes (revisado por Holmes, 2002; Roegava, 2002; Tanzi & Bertram, 2001). Dentre as variações genéticas temos inserções, deleções e mutações *missenses* que podem ser mais ou menos agressivas, alterando em muitos casos o início do aparecimento dos sintomas.

Diversos genes associados a doenças neurológicas e psiquiátricas são estudados como candidatos potenciais a modificadores da idade de início de aparecimento da DAIP e DAIT. Recentes estudos indicam que alterações no sistema dopaminérgico, importantes para mecanismos de comunicação neuronal (Moreno-Castilla *et al.*, 2016), também podem estar envolvidas no aparecimento da doença (Rossato *et al.*, 2009; Broussard *et al.*, 2016). Em alguns

desses casos, histológica e fisiologicamente, a DA induz a perda de função e redução no número de diversos neurotransmissores como acetilcolina, noradrenalina e serotonina (Francis *et al.*, 1999; Thomsen *et al.*, 1991). No cérebro, em especial no hipocampo, a redução da capacidade dos neurotransmissores prejudica as sinapses entre os neurônios, aumentando a neurodegeneração e, por consequência, a perda progressiva da memória (Nobili *et al.*, 2017). Desta forma, o aparecimento de disfunções cognitivas, anormalidades comportamentais, alterações de humor e mesmo sintomas não cognitivos, frequentemente relatados em pacientes com DA, demonstram estar intimamente relacionados a polimorfismos em genes associados a estas vias neurológicas (Lammel *et al.*, 2008).

1.2 A hipótese β -amiloide

O estudo sobre DA tem sido alvo de diversas pesquisas e existem ao menos três diferentes propostas de como ocorre o desenvolvimento desta patologia. Dentre estas, temos a do mecanismo extracelular (a hipótese da cascata $A\beta$), do mecanismo intracelular (Capetillo-Zarate *et al.*, 2012; Takahashi *et al.*, 2013) e da indução de $A\beta$ através de estresse oxidativo (Butterfield *et al.*, 2013). A hipótese da cascata $A\beta$ (Figura 1) é amplamente aceita pela comunidade científica e foi primeiramente proposta pelos pesquisadores Hardy e Allsop, em 1991, sendo atualizada por Hardy e Selkoe em 2002.

Segundo esta hipótese, o processo de clivagem da proteína APP, em sua via constitutiva, inicia-se com a chegada da APP no sítio de clivagem da α -secretase (Kuhn *et al.*, 2010). Esta enzima promove uma clivagem da APP em um sítio mais curto, garantindo no final do ciclo um peptídeo de menor comprimento e, portanto, não-amiloidogênico. Dois fragmentos menores são liberados nesse processo: o sAPP α e o fragmento α -C-terminal (CTF α ou C83). O peptídeo sAPP α é liberado no meio extracelular, enquanto o CTF α permanece na membrana celular dos neurônios e é posteriormente clivado pelo complexo γ -secretase. Ambos fragmentos são considerados não-amiloidogênicos, sendo o sAPP α ainda citado por suas propriedades protetivas.

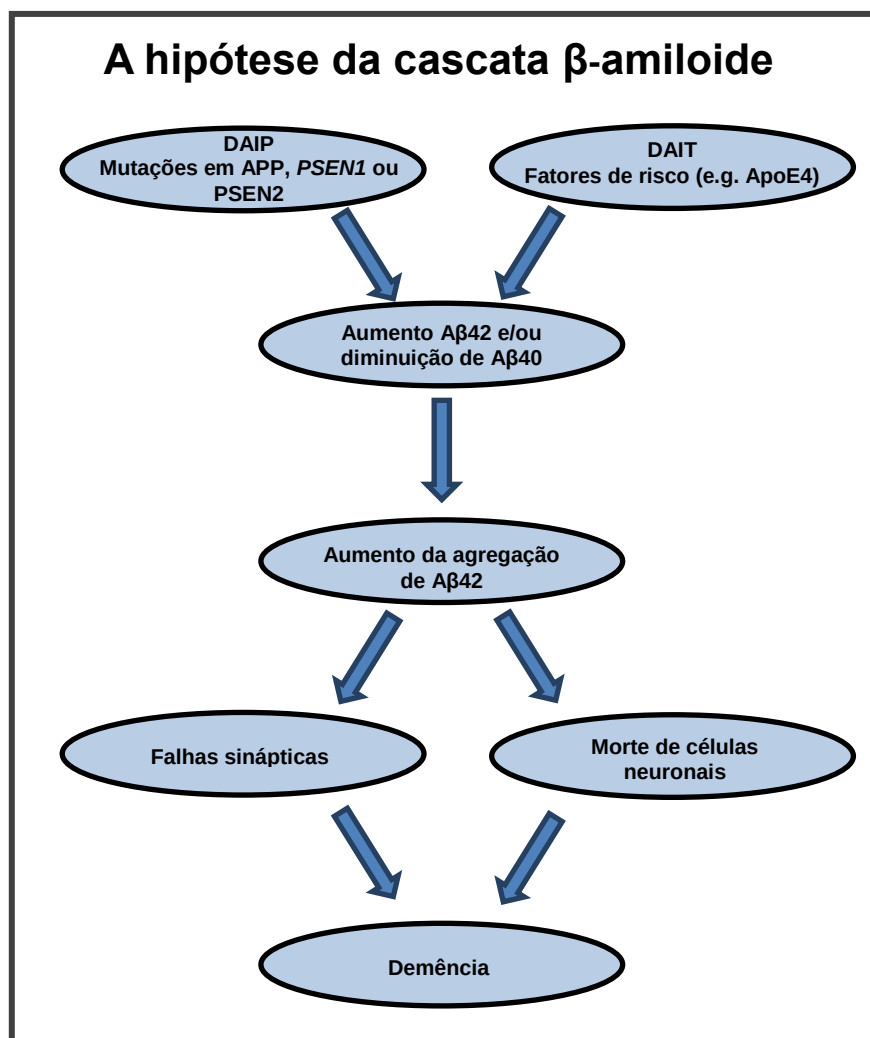


Figura 1. Hipótese da cascata beta-amiloide que resulta nos eventos patogênicos que conduzem à DA. Mutações genéticas desencadeiam desequilíbrio na produção de $A\beta_{40}$ e $A\beta_{42}$, o que acarreta na agregação de $A\beta_{42}$, formando oligômeros tóxicos que promovem falhas sinápticas e ocasionam na morte de células neuronais, levando o paciente à demência.

Outra via em que ocorre a clivagem da APP é a amiloidogênica, no qual participam os complexos β e γ -secretase. Após o recebimento da APP a enzima 1 de clivagem do sítio-beta da APP (BACE1) (Vassar *et al.*, 1999) promove a clivagem do peptídeo, resultando em dois fragmentos: o sAPP β e o CTF β (C99) (Figura 2). O fragmento C-terminal desta via (C99) é um peptídeo de cadeia mais longa em comparação ao C83, e ambos seguirão para o complexo da γ -secretase. O C83 apresenta-se como substrato desta última clivagem e os peptídeos P3 e domínio intracelular APP (AICD) são gerados. Na via amiloidogênica o substrato C99 entra em seu processo de clivagem e após a proteólise terá como resultado $A\beta$ e o AICD, sendo este último de funções ainda desconhecidas (Beckett *et al.*, 2012).

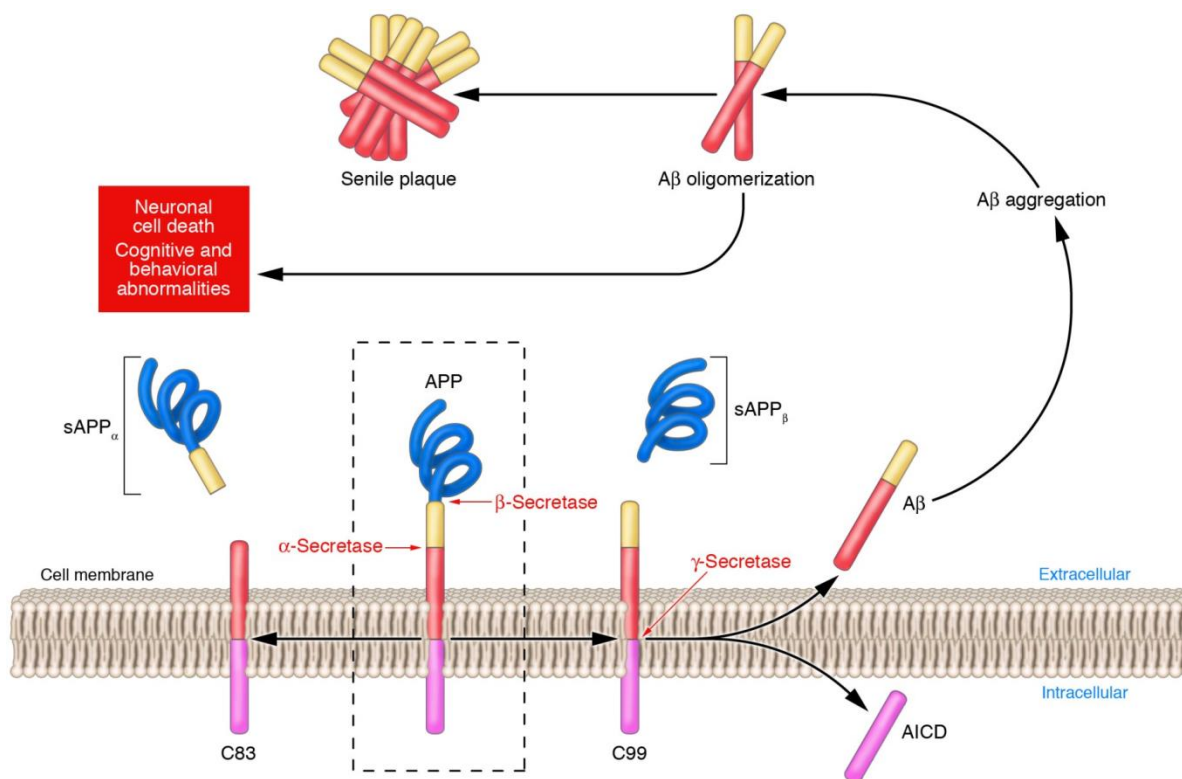


Figura 2. Representação esquemática do processamento de APP e acumulação de Aβ. O APP maduro (centro, dentro da caixa tracejada) é metabolizado por duas vias concorrentes: a via α-secretase que gera sAPPα e C83 (também conhecido como CTFα) (à esquerda); e a via β-secretase que gera sAPPβ e C99 (à direita). O fragmento carboxil-terminal C99 é clivado pela γ-secretase para gerar Aβ e o domínio intracelular APP (AICD). O fragmento carboxil-terminal C83 também é clivado pela γ-secretase para os peptídeos P3 secretados (não mostrado). Aβ agrega em pequenos multímeros (dímeros, trímeros, e assim por diante), conhecidos como oligômeros. Os oligômeros parecem ser as neurotoxinas mais potentes, ao passo que a placa senil, em fase terminal, é relativamente inerte (retirado de Gandy, 2005).

Os Aβ de cadeia mais extensa possuem propriedades aglutinativas e favorecem a formação de monômeros, dímeros e posteriormente oligômeros no meio extracelular do cérebro (Figura 3). Os pesquisadores Jimenez & Velez (2015) afirmam que mutações nos genes *APP*, *PSEN1* e *PSEN2* desencadeiam um aumento na taxa de $A\beta_{42}/A\beta_{40}$, embora não se saiba ao certo o motivo desta clivagem em diferentes regiões do peptídeo. A capacidade de $A\beta_{42}$ se agregarem é bastante difundida e estudos mostram que os $A\beta_{40}$ possuem propriedades que previnem a oligomerização (Yan & Wang 2007). O aumento do número de $A\beta_{42}$ possui propriedades neurotóxicas que causam danos às sinapses nervosas e após o aumento da oligomerização, ocorrem problemas na homeostase neuronal, levando à morte de neurônios e consequente perda nas transmissões sinápticas, acarretando na demência (Hardy & Selkoe 2002).

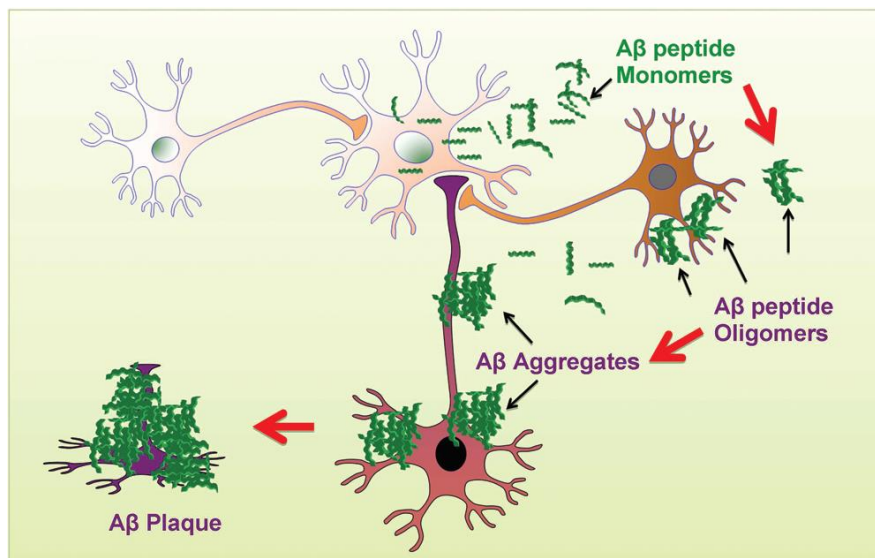


Figura 3. A hipótese A β sugere que os peptídeos A β participam na patogênese da DA. Os peptídeos, que são produzidos por neurônios e outras células cerebrais se agregam (formação de estruturas “ β -sheet”) em uma variedade de conjuntos de tóxicos, emaranhados neurofibrilares e placas neuríticas (retirado de Kung, 2012).

1.3. Proteína precursora β -amiloide (APP)

A proteína precursora β -amiloide (APP) foi sequenciada pela primeira vez pelos pesquisadores Glenner e Wong (1984) enquanto estudavam a trissomia do cromossomo 21 responsável por causar Síndrome de Down. A descoberta do gene codificante da APP no mesmo cromossomo (21q21.2) levou estudiosos a hipóteses que a associavam à demência (Goate *et al.*, 1991; Kang *et al.*, 1987; Tanzi *et al.*, 1987; Robakis *et al.*, 1987).

A APP é uma glicoproteína transmembrana do tipo I que possui 10 encadeamentos alternativos, o que lhe confere variações entre 304 e 770 aminoácidos (aa) (Bayer *et al.*, 2001). Esta é formada através de um processo proteolítico sequencial que ocorre em diversas células neuronais e não neuronais, sendo comumente observada no plasma humano (Nilsberth *et al.*, 2001); a isoforma mais abundante é formada por 695 aa (Bruno *et al.*, 2005).

O gene *APP* apresenta 17 éxons e 643 variantes genéticas já foram identificadas. Estudos sugerem que mais de 50 dessas variações estão associadas à forma familiar e precoce da doença DA. As mutações descritas geralmente levam a uma clivagem irregular da APP e o consequente aumento da taxa de A β_{42} /A β_{40} . Dentre os éxons do gene, o 16 e o 17, que codificam a região C-terminal da proteína, são descritos por apresentarem mais de 25

mutações. Essas variantes são classificadas como *missenses* e deleções de íntrons, sendo todas já associadas à DAIP. Deste rol de 25 mutações, sabe-se que o éxon 17 apresenta, sozinho, 22 variantes genéticas. O pesquisador Di Fede e seus colaboradores (2009), em um dos raros casos de doença autossômica recessiva ligada à DA, descreveram a mutação que acarreta a troca de alanina por valina na posição 673 da proteína (A673V), o que leva a um aumento na taxa $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ e consequente aparecimento da DA. Neste mesmo gene, no éxon 16, outra variação foi observada, no qual ocorre a troca de alanina por treonina (A673T) (rs63750847), resultando na diminuição de até 40% na produção de $A\beta_{42}$. Estes estudos foram realizados em pacientes da Islândia e sugerem que esta variante de algum modo impede a clivagem do APP pela BACE1 e expressa um fator protetivo contra a DA (Jonsson *et al.*, 2012).

1.3.1 β -amiloides

Master e seus colaboradores (1985) foram os primeiros a registrar o principal componente das placas senis do cérebro humano. O $A\beta$ é o produto do processamento proteolítico da APP (Haass *et al.*, 1992) e é produzido na via secretora ou endossomal-lisossomal de diversas células. Na literatura tem sido mostrado que o $A\beta$ pode apresentar diversos tamanhos, uma vez que a APP é passiva de sofrer clivagens alternativas pelo complexo γ -secretase (Selkoe, 1994; Vassar *et al.*, 1999). O fragmento mais comumente encontrado apresenta 40 aa, entretanto mutações genéticas favorecem diferentes clivagens e o aparecimento de $A\beta$ constituídos de 39-49 aa (Acx *et al.*, 2013; Qi-Takahara *et al.*, 2005; Takami *et al.*, 2009; Vigo *et al.*, 1993).

Os $A\beta$ com 42 aminoácidos ($A\beta_{42}$) estão associados ao desenvolvimento da DA. Jarret e seus colaboradores (1993) descreveram que dois aminoácidos a mais, localizados na parte C-terminal da proteína, tornam esse fragmento mais propenso à agregação e consequentemente à formação de monômeros, dímeros e oligômeros. Os resíduos adicionados ao C-terminal também conferem ao $A\beta_{42}$ maior rigidez quando comparado ao $A\beta_{40}$ (Schmechel *et al.*, 1993). Esses estudos sugerem que a diferença entre os $A\beta_{40}$ e $A\beta_{42}$ não é apenas estrutural, mas conformacional, pois as proteínas típicas exibem dobras bem definidas, enquanto os monômeros de $A\beta_{42}$ apresentam diferentes contornos instáveis e mal determinados (St George-Hyslop & Petit, 2004).

A agregação destes monômeros de $A\beta_{42}$ promove o aparecimento de oligômeros. Os oligômeros de menores tamanhos se mostram mais tóxicos quando comparados aos de

tamanho maior (Ono *et al.*, 2009; Cizas *et al.*, 2010) e além disso, a relação entre seu tamanho e sua conformação aparenta ter um importante papel no agravamento de sua toxicidade (Broersen *et al.*, 2010). Diversos mecanismos distintos sobre a atuação dos oligômeros em células neuronais são estudados, entretanto não há consenso sobre seu real modo de atuação na DA. Sabe-se, contudo, que a interação com células neuronais possui propriedades neurotóxicas (Jan *et al.*, 2008; Jan *et al.*, 2011,) que impedem a transmissão das sinapses nervosas e causam morte na célula atingida (Haass & Selkoe, 2007).

1.3. Presenilinas

A γ -secretase é um complexo proteolítico (Figura 4) responsável pela catálise da última etapa da clivagem do APP que origina o A β . Esse complexo é composto por 4 partes: Nicastrin (glicoproteína transmembrana do tipo I (Yu *et al.*, 2000)), APH1 (proteína transmembrana politópica (Gu *et al.*, 2003)), Presenilina-1 (ou Presenilina-2) e a PEN-2 (proteína hidrofóbica com dois domínios transmembranos (De Strooper, 2003; Edbauer *et al.*, 2003; Tolia & De Strooper, 2009)).

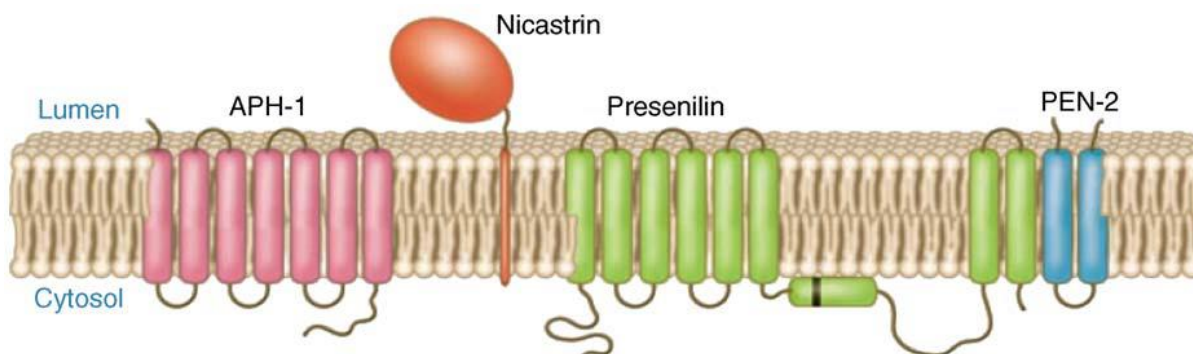


Figura 4. Representação esquemática dos quatro componentes do complexo γ -secretase. O complexo γ -secretase é composto de um componente catalítico, presenilina, e três cofatores, Nicastrina, APH-1 e PEN2. A presenilina é ativada biologicamente por endoproteólise que gera dois heterodímeros. Cada heterodímero apresenta o resíduo chave de aspartato (retirado de Gandy, 2005).

A γ -secretase pode apresentar quatro diferentes complexos proteolíticos, devido a existirem duas formas de presenilina e duas de APH1 (Acx *et al.*, 2013). Estas quatro variantes do complexo γ -secretase proporcionam clivagens em diferentes regiões do APP e conseqüentemente diferentes comprimentos de A β . A presenilina 1 (*PSEN1*) e a presenilina 2

(*PSEN2*) são proteínas similares e consideradas o núcleo catalítico do complexo (Kung, 2012). O gene da *PSEN1* está localizado no cromossomo 14 e é composto de 13 éxons, sendo 10 deles codificantes (éxons 3-12) (Puglielli *et al.*, 2003). A proteína apresenta seis diferentes isoformas, que variam entre 184-467 aa (Bruno *et al.*, 2005), e podem ser encontradas no complexo de Golgi, retículo endoplasmático, membrana nuclear e membrana celular (Strooper *et al.*, 1997; Walter *et al.*, 1996). Conforme demonstrado na figura 5, em toda a extensão da proteína são encontrados oito domínios transmembranos, sendo todos de grande conservação entre diferentes espécies. A grande conservação de suas regiões intramembranas sugere que mutações nestas áreas poderiam afetar a estrutura e/ou a função da proteína.

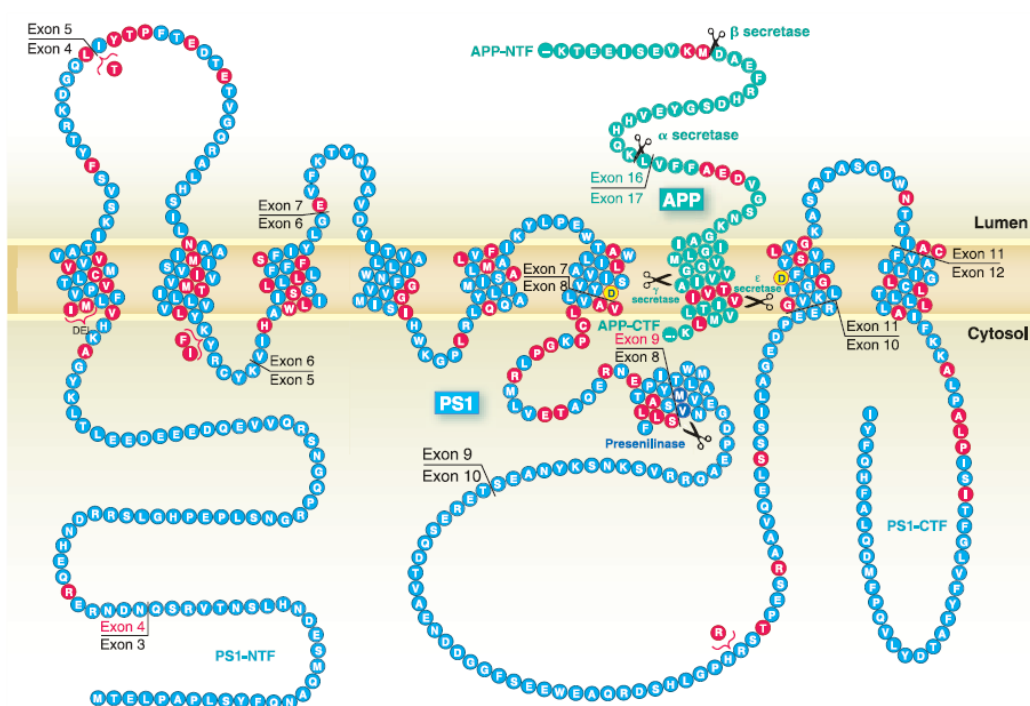


Figura 5. Sequência de aminoácidos da *PSEN1* (círculos azuis) e da porção C-terminal da APP (círculos verdes) gerando Aβ. Mutações em *PSEN1* e APP são conhecidas por causar DA familiar e estão representadas em vermelho. Os sítios de clivagem β, α, γ, ε são indicados por pequenas tesouras. Os dois aminoácidos envolvidos na clivagem endoproteolítica da *PSEN1* são mostrados em azul escuro. Os dois resíduos de aspartato do sítio catalítico da *PSEN1* são realçados em amarelo. Junções de éxons também são mostrados. CTF, fragmento C-terminal de *PSEN1*; NTF, fragmento N-terminal de PSEN (retirado de Hardy & Selkoe 2002).

Até o momento, mais de 216 mutações (Alzheimer Disease & Frontotemporal Dementia Mutation Database, 2018) associadas à DA foram encontradas na *PSEN1* e muitas alteram a conformação de seu sítio de clivagem. Estima-se que apenas mutações na *PSEN1* acarretam entre 18 e 50% dos casos de doença autossômica dominante ligada à DA (Yasuda *et al.*, 1999).

Arcos-Burgos e seus colaboradores (2015) sugerem que a mutação E280A, localizada no éxon 8, tem a capacidade de aumentar a taxa de $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ e pacientes carreadores desta mutação desenvolvem a doença até 10 anos mais cedo. Dados na literatura mostram que os éxons 5, 7 e 8 apresentam 59% das variantes encontradas neste gene (Gráfico 1).

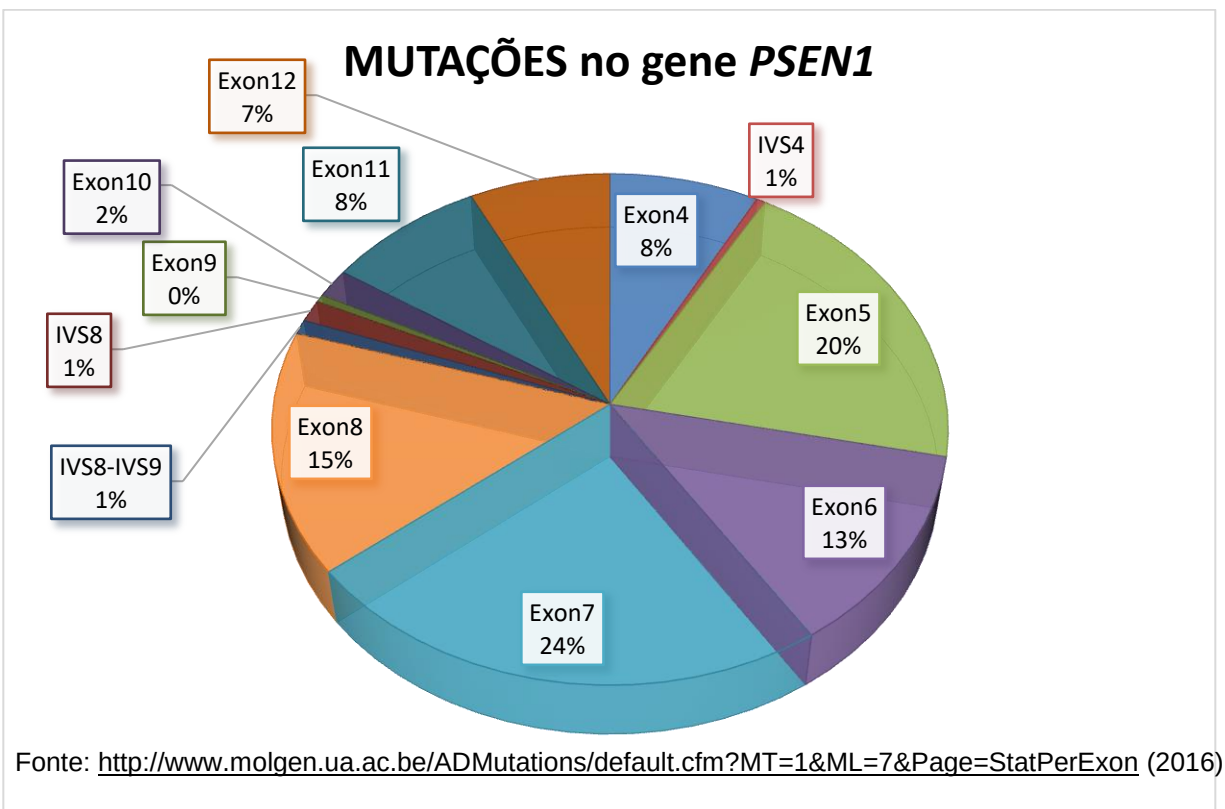


Gráfico 1. Porcentagem das mutações encontradas em cada éxon do gene *PSEN1*.

Uma vez que os éxons cinco, sete e oito apresentam um grande número de mutações causadoras da DAIP (59%), este projeto tem por finalidade realizar o diagnóstico molecular dos pacientes numa coorte do Rio de Janeiro, através do sequenciamento destas regiões.

1.4. *Catechol-O-methyltransferase (COMT)*

Recentemente novos genes estão sendo associados à DA e com eles novas vias relacionadas também são descobertas. O gene *COMT* é composto por 6 éxons (figura 6) com uma extensão de 2437 pb, localiza-se no cromossomo 22q11 (Grossman *et al.*, 1992) e é responsável pela codificação de uma proteína que desempenha um papel crucial na regulação da dopamina, mediando as funções cognitivas. Esta enzima sintetizada é responsável por

degradar a dopamina liberada sinapticamente no córtex pré-frontal (Matsumoto *et al.*, 2003; Tunbridge *et al.*, 2006, 2007), que em altas concentrações aumenta a relação sinal-ruído neuronal, crítico para um processamento cognitivo eficiente (Egan *et al.*, 2001).

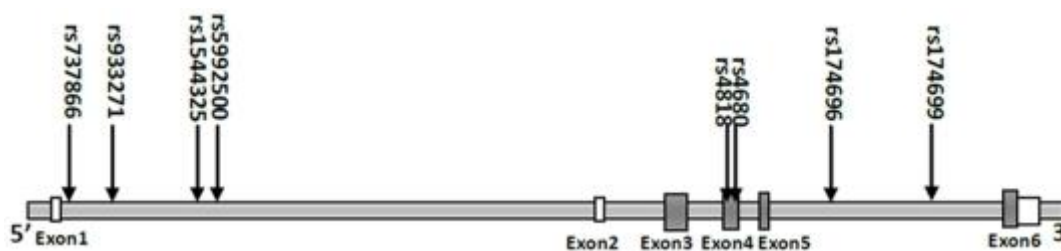


Figura 6. Estrutura do gene humano *COMT* e localização de oito SNP de marcação (Li *et al.*, 2011).

O SNP Val158Met (rs4680) é descrito como um importante modulador da atividade desta enzima. A atividade enzimática elevada gerada pelo genótipo Val/Val (GG) deste polimorfismo aumenta de 3 a 4 vezes o metabolismo da dopamina (Chen *et al.*, 2004), sendo associado com esquizofrenia, transtorno bipolar (Hosak, 2007) e influenciando sobre a idade de aparecimento da DA (Martinez *et al.*, 2009, Thornton *et al.*, 2011, Lanni *et al.*, 2012). Outros estudos também apontam este genótipo como um fator de risco para anormalidades comportamentais, sintomas psicológicos e DA (Borroni *et al.*, 2007; Sweet *et al.*, 2005; Ji *et al.*, 2014). Todavia, a troca do aa valina pela metionina confere uma redução na degradação da dopamina no córtex pré-frontal e portadores do polimorfismo possuem uma vantagem nas funções executivas e no desempenho da memória, quando comparados aos homozigotos portadores de valina (Witte e Flöel, 2012). Tais benefícios cognitivos são correlacionados com maior ativação cerebral e, por consequência, um processamento de informação mais eficiente (Egan *et al.*, 2001, Sambataro *et al.*, 2009). Contudo, o genótipo Met/Met é largamente associado à dependência alcoólica, anormalidades comportamentais, sintomas psiquiátricos (Schellekens *et al.*, 2012, Tiihonen *et al.*, 1999), mudanças na transmissão dopaminérgica no córtex pré-frontal (Ho *et al.*, 2005, Tunbridge *et al.*, 2013) e anormalidades do lobo frontal ou temporal (Gennatas *et al.*, 2012). Os resultados envolvendo este polimorfismo necessitam de maiores avaliações e alguns estudos indicam que o genótipo Val/Val nem sempre se mostra um fator de risco para a DA. Trabalhos científicos sugerem que a presença do alelo G se comporta como fator protetivo em Asiáticos portadores de DA e doença de Parkinson (Lee & Song, 2014; Lu *et al.*, 2013). Alguns estudos sugerem que indivíduos AA são mais susceptíveis a desenvolver *major depressive disorder* (MDD).

1.5. *Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)*

O gene *Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)* também é associado à DA. Este é localizado no cromossomo 11p14, composto por 4766 pb e possui 8 éxons, sendo apenas o último codificante (Bodner *et al.*, 2015). O gene produz uma proteína expressa em todo o cérebro, em especial no hipocampo, sendo responsável por promover a plasticidade sináptica, a sobrevivência neuronal, a proliferação, a regeneração, a conectividade, o desenvolvimento neuronal e de suas funções (Russo-Neustadt, 2003). Outras importantes funções são constantemente correlacionadas com o *BDNF*, que tem atribuições moduladoras fundamentais para aprendizagem, memória, cognição e comportamento (Binder e Scharfman, 2004). Além de ser atribuído a importantes funções, o *BDNF* tem sido implicado na etiopatogenia de distúrbios afetivos, estresse pós-traumático, transtorno de déficit de atenção, esquizofrenia, e doenças neurodegenerativas, como DA (Gratacos *et al.*, 2007; Russo-Neustadt, 2003).

O SNP Val66Met (rs6265) é a troca de uma base nitrogenada (C>T) no códon 66 do éxon 8 do gene *BDNF*, acarretando em uma substituição de aminoácidos de valina (Val) para metionina (Met) na proteína sintetizada. Estudos relatam que esta troca de aa no polipeptídeo afeta a embalagem e o tráfego intracelular, alterando a secreção da proteína amadurecida (Egan *et al.*, 2003). Quando comparados aos controles, indivíduos com DA, portadores do genótipo Met/Met, são descritos com reduzidos níveis da proteína *BDNF* no sistema nervoso central e no cérebro, destacando-se o hipocampo (Hock *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2005). Estudos anteriores descrevem que pessoas com o genótipo Met/Met apresentam menor velocidade de processamento de informações, inteligência diminuída (Miyajima *et al.*, 2008), memória episódica atrasada, desempenho da memória reduzido (Yamada *et al.*, 2002) e reduções do volume de matéria cinzenta do hipocampo (Pezawas *et al.*, 2004).

Entretanto, mesmo com uma quantidade de estudos que afirmam uma associação com diversos distúrbios e DA, outros não conseguiram corroborar essa descoberta (Li *et al.*, 2005; Vepsäläinen *et al.*, 2005). Fukumoto e colaboradores, em 2010, desenvolveram uma meta-análise na qual houve uma associação positiva do alelo Met (rs6265) apenas com pacientes portadores de DA do sexo feminino.

1.6. Phospholipase C- γ 2 (*PLCG2*)

Este gene, localizado no cromossomo 16, é composto por 32 éxons e recentes estudos sinalizam que sua via de atuação está relacionada com diversas doenças como deficiência de anticorpos e desregulação imunológica (PLAID), autoinflamação e PLAID (APLAID) e neurodegenerativas. A proteína *PLCG2* é expressa principalmente no cérebro humano, sendo comumente encontrada em células da microglia. Apresenta diversas isoformas, variações de *splicings*, deleções e mutações que afetam sua região reguladora auto-inibitória, resultando na disfunção na sinalização celular (Milner, 2015). É uma enzima sinalizadora transmembrana, que após estímulos de alguns receptores hidrolisa o fosfolípido fosfatidil inositol-4,5-bisfosfato (PIP2) em duas moléculas mensageiras secundárias: inositol 1,4,5 trifosfato (IP3) e DAG (diacilglicerol). O IP3, que é liberado no citosol, se liga a canais iônicos do retículo endoplasmático e estimula a liberação de cálcio do RE para o citoplasma. O DAG permanece na membrana e é responsável por catalizar a cascata de sinalização de diversas enzimas, como proteína quinase C (PKC) e proteínas liberadoras de Ras guanil-nucleotídeo (RasGRPs). (Cocco *et al.*, 2015; Smrcka A.V. *et al.*, 2015).

Diferentemente de diversas mutações encontradas, algumas delas apresentam características protetivas. A mutação Pro522Arg (rs72824905) causada pela troca de uma citosina para guanina (C>G) provoca uma mudança de carga na região, que passa de não carregada a positivamente carregada, alterando a estrutura proteica. Esta mudança na estrutura reduz a autoinibição da *PLCG2*, aumentando sua sinalização e induzindo a ativação da inflamação e imunidade inata (Bae *et al.*, 2017; Giannelou *et al.*, 2014).

1.7. Triggering receptor expressed on myeloid cells (*TREM2*)

O gene *Triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM2)*, localizado no cromossomo 6, possui 5 éxons e codifica um receptor de membrana que é expresso em células da microglia e macrófagos periféricos (Colonna & Wang, 2016). Este gene codifica uma glicoproteína de membrana que está envolvida no complexo de sinalização celular, juntamente com algumas proteínas de ligação (Lue *et al.*, 2015). Algumas funções deste receptor são descritas pela literatura, dentre elas a migração, sobrevivência e proliferação celular, liberação de citocinas e fagocitose (Kleinberger *et al.*, 2014; Ulrich e Holtzman, 2016; Yuan *et al.*, 2016).

Diversos estudos sugerem que mutações em genes relacionados com a resposta imunológica podem estar envolvidas na inflamação crônica (Bouchon *et al.*, 2000). Ademais, mutações nos genes *TREM2* e *PLCG2*, ambos relacionados com a imunidade e expressos principalmente em células da microglia, estão se mostrando fatores de risco e proteção à DA (Jonsson *et al.*, 2013; Prinz *et al.*, 2013). Embora diversas associações destes genes com a DA estejam sendo descobertas, ainda não se sabe como as alterações no sistema imunológico contribuem para o avanço da doença (Golde *et al.*, 2013; Jin *et al.*, 2014; Sims *et al.*, 2017). Contudo, sabe-se que mutações no gene *TREM2* reduzem ou incapacitam células da microglia em desempenhar seu papel fagocítico das placas amiloides (Jonsson *et al.*, 2013; D'Andrea *et al.*, 2004; Schlepckow *et al.*, 2017; Thornton *et al.*, 2017). Então, uma hipótese sugerida é que estas disfunções aumentam o acúmulo de placas β -amiloides no cérebro do paciente e desencadeie uma série de eventos como alterações na imunidade inata, taupatias e neurodegeneração (Musiek & Holtzman, 2015).

2. JUSTIFICATIVA

A DA é a forma mais comum de demência, afetando de 50-75% das pessoas que sofrem com esta patologia. Essa é uma doença neurodegenerativa de início tardio, sendo a maior parte das pessoas diagnosticada com mais de 65 anos. No entanto, existem raros casos de DA (2-5%), que acometem indivíduos precocemente. Apesar dos fatores etiológicos da DAIT ainda não serem totalmente elucidados, se sabe que a DAIP apresenta um componente genético de risco e um padrão de herança autossômico dominante. Atualmente mais de 330 mutações já foram descritas, sendo todas estas encontradas em apenas 3 genes (*APP*, *PSEN1* e *PSEN2*). Estes genes codificam proteínas que atuam na cascata β -amiloide. Nesta cascata, o substrato inicial (*APP*) recebe sucessivas clivagens pela BACE1 e γ -secretase, originando monômeros de β -amiloides. Os monômeros de $A\beta_{42}$ possuem uma maior propensão a uma oligomerização e o aumento do número de oligômeros mostra-se neurotóxico ao organismo humano. Algumas mutações encontradas em indivíduos afetam a clivagem da *APP*, levando a um aumento do número de $A\beta_{42}$ e consequentemente ao desenvolvimento da DA.

Descobertas recentes em diversos genes estão levando a comunidade científica a ampliar o espectro de mutações que se mostram como um fator de risco para a DA. Os genes *COMT*, *BDNF*, *PLCG2* e *TREM2* atuam em diferentes vias metabólicas do organismo humano e podem estar ligados à doença. Estudos em todo o mundo buscam um melhor entendimento dos genes e sua real influência sobre o início do aparecimento da DA.

Neste contexto, acredita-se que a análise de genes candidatos, como *COMT*, *BDNF*, *PLCG2*, *TREM2* e *PSEN1* contribuirá para a compreensão dos mecanismos moleculares e a fisiopatologia da doença, podendo suscitar novos alvos terapêuticos e estratégias de tratamento. Assim, cada vez mais, o estudo da genética aumentará o conhecimento do *background* da DA e possibilitará no futuro o desenvolvimento de medicamentos e drogas direcionadas para cada paciente.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo principal

O presente estudo analisou a associação de variantes genéticas nos genes *COMT*, *BDNF*, *PLCG2*, *TREM2* e *PSEN1* com o desenvolvimento da DA, investigando sua contribuição para o surgimento da doença.

3.2. Objetivos secundários

1. Realizar o sequenciamento dos éxons 5, 7 e 8 do gene *PSEN1* em uma amostra de 74 pacientes com DA.
2. Investigar as mutações Val158Met (rs4680) do gene *COMT*, Val66Met (rs6265) do gene *BDNF*, Pro522Arg (rs72824905) do gene *PLCG2* e Arg62His (rs143332484) do gene *TREM2* na amostra total. Analisar a mutação Pro522Arg (rs72824905) do gene *PLCG2* na amostra.
3. Avaliar estatisticamente as variantes genéticas encontradas, a fim de verificar se desempenham um papel relevante na etiologia da doença de Alzheimer.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostras

O presente estudo foi realizado com pacientes que buscam atendimento no Posto de Saúde de Campos Elísios e no Instituto de Psiquiatria da Universidade Federal do Rio de Janeiro. A amostra é composta por 332 indivíduos, sendo 258 controles e 74 pacientes portadores da DA e aceitos nos critérios de inclusão. O projeto foi enviado e aprovado pelo Comitê de Ética da UNIGRANRIO nº:43112214.0.0000.5283 (anexo A). Todos os indivíduos que concordaram em participar do estudo assinaram o termo de consentimento livre esclarecido (TCLE), conforme anexo B e C.

4.1.1 Critérios de inclusão e exclusão

A seleção das amostras de pacientes foi baseada no diagnóstico para a doença de Alzheimer, seguindo os critérios listados pelo *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association* (NINCDS-ADRDA) (Mckhann *et al.*, 1984; Mckhann *et al.*, 2011). A avaliação clínica foi realizada através da análise do *Clinical Dementia Rating* (CDR) (Maia *et al.*, 2006), enquanto o exame de imagem realizado foi a tomografia computadorizada (TC) do crânio. O CDR (Quadro 1) é um exame clínico que consiste em uma avaliação através de perguntas e respostas onde o desempenho cognitivo e funcional do indivíduo é mensurado, considerando uma escala que varia de 0 a 3. Desta forma, seis domínios cognitivos são avaliados, obtendo-se ao final uma classificação do grau de severidade da demência que acomete o paciente (Montaño e Ramos, 2005).

Dano	Nenhum (0)	Questionável (0,5)	Leve (1)	Moderado (2)	Grave (3)
Memória	Sem perda de memória ou perda leve e inconstante.	Esquecimento constante, recordação parcial de eventos.	Perda de memória moderada, mais para eventos recentes, atrapalha as atividades de	Perda grave de memória, apenas assunto altamente aprendido é recordado.	Perda de memória grave. Apenas fragmentos são recordados.

			vida diária		
Orientação	Completa Orientação	Completamente orientado com dificuldade leve em relação ao tempo.	Dificuldade moderada com relação ao tempo, orientado em áreas familiares.	Dificuldade grave com relação ao tempo, desorientado quase sempre no espaço.	Apenas orientado em relação a pessoas.
Julgamento e solução de problemas	Resolve problemas diários, como problemas financeiros; julgamento preservado.	Dificuldade leve para solucionar problemas, similaridades e diferenças.	Dificuldade moderada em lidar com problemas, similaridades e diferenças, julgamento social mantido.	Dificuldade séria em lidar com problemas, similaridades e diferenças, julgamento social danificado.	Incapaz de fazer julgamento ou resolver problemas.
Relações Comunitárias	Função independente no trabalho, compras, grupos sociais.	Leve dificuldade nestas tarefas.	Não é independente nestas atividades, parece normal em uma inspeção casual.	Não há independência fora de casa, parece bem o bastante para ser levado fora de casa.	Não há independência fora de casa, parece doente o bastante para ser levado fora de casa.
Lar e Passatempos	Vida em casa, passatempos e interesses intelectuais mantidos.	Vida em casa, passatempos, interesses intelectuais levemente prejudicados.	Prejuízo suave em tarefas em casa, tarefas mais difíceis, passatempo e interesses abandonados.	Apenas tarefas simples são preservadas, interesses muito restritos e pouco mantidos.	Sem função significativa em casa.
Cuidados Pessoais	Completamente capaz de cuidar-se	Completamente capaz de cuidar-se.	Necessita de ajuda.	Requer assistência ao vestir-se, para higiene.	Muita ajuda para cuidados pessoais, incontinências frequentes.

Quadro 1. Classificação do CDR e os impactos funcionais que cada fase da doença deve apresentar (Adaptado de Montañó e Ramos, 2005).

A amostra de controles voluntários foi coletada de indivíduos acima de 55 anos que não apresentem a DA, demência ou demência secundária. Foram excluídos da pesquisa indivíduos que desenvolveram demência secundária, ou seja, demência causada por doenças como cerebrovasculares, tumores cerebrais, dentre outras.

As equipes da Geriatria e Gerontologia do Programa de Atenção Integrada da Saúde do Idoso do Município de Duque de Caxias e do Instituto de Psiquiatria da Universidade Federal do Rio de Janeiro, formada por médicos especializados, foram os colaboradores responsáveis pelo diagnóstico clínico dos participantes.

4.2. Métodos

O plano de trabalho foi fundamentado em diversas metodologias de biologia molecular, sendo o fluxograma do trabalho proposto ilustrado abaixo para facilitar o entendimento das técnicas empregadas nesta pesquisa (Figura 7).

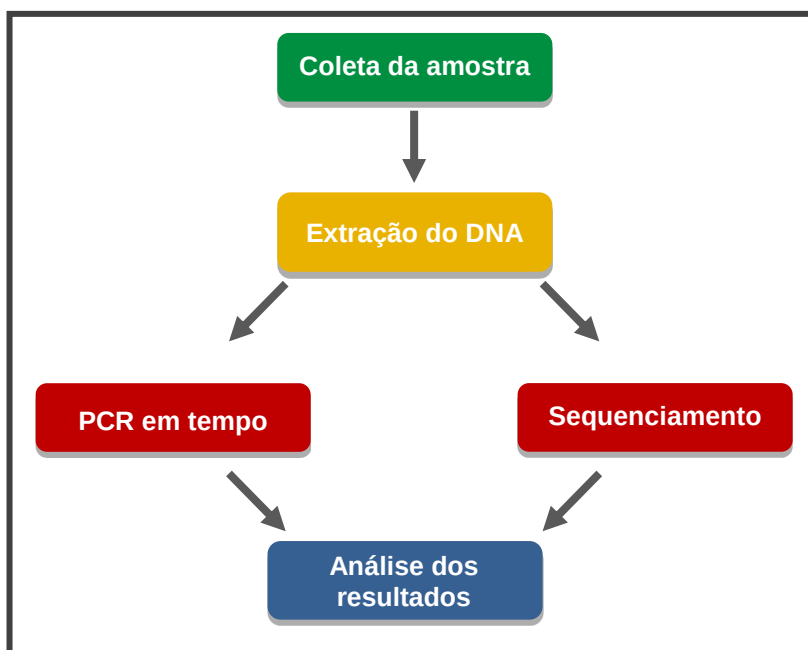


Figura 7. Fluxograma do plano de trabalho.

4.2.1 Coleta de sangue

A coleta da amostra de sangue foi realizada por profissionais capacitados do Posto de Saúde de Campos Elísios e do Hospital Deolindo Couto. O material coletado foi encaminhado e analisado no Laboratório de Genética Humana da UNIGRANRIO (LabGen).

4.2.2 Extração do DNA

Todas as amostras de DNA foram extraídas a partir de células de sangue periférico utilizando o kit “*FlexiGene DNA Kit*” (Qiagen®) de acordo com o protocolo do fabricante. A partir de 100 µL de sangue foram adicionados 250µL do tampão FG1 em um tubo *ependorf*, que foi invertido 5 vezes. O tubo foi levado para a centrífuga durante 1 minuto a 10.000 RPM. O sobrenadante foi descartado e o tubo novamente invertido até que o pellet fique totalmente seco. Misturou-se o tampão FG2 e a protease em um tubo *ependorf*. Adicionou-se 50µL do tampão FG2/protease e homogeneizado no *vortex* até que o pellet fosse dissolvido completamente. O tubo foi invertido algumas vezes e incubado a 65°C por 5 minutos. Então, adicionou-se 50µL de isopropanol absoluto até que a precipitação do DNA ficasse visível. A amostra retornaram para a centrífuga por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. Posteriormente foram adicionados 50µL de etanol 70%, vortexado e centrifugado. O sobrenadante foi descartado e finalmente foi adicionado 50µL do tampão FG3, vortexando e o incubando a 65°C por 10 minutos.

A integridade do DNA foi visualizada em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio. O DNA extraído foi quantificado a partir do equipamento *Denovix* e então armazenado em freezer -20°C no LabGen da UNIGRANRIO.

4.2.3 PCR em tempo real

As mutações Val158Met, Val66Met, Arg62His e Pro622Arg foram analisadas nas amostras através da técnica de PCR em tempo real, utilizando sondas *TaqMan*®. Neste experimento,

foram adquiridas sondas específicas para cada alelo analisado que apresentam diferentes fluoróforos para facilitar sua identificação. As sondas são oligonucleotídeos com um repórter (fluoróforo) na extremidade 5' e um *quencher* (silenciador) na extremidade 3'. Enquanto a sonda está intacta, a proximidade do *quencher* reduz a fluorescência do repórter, uma vez que aquele absorve a energia e a libera na forma de calor para o meio. No entanto, se a região alvo estiver presente, a sonda se anela entre os oligonucleotídeos e no momento da extensão, a DNA polimerase a cliva através da atividade 5' nuclease. Ao separar o repórter do *quencher*, há um aumento de fluorescência no meio, possibilitando identificar os alelos/genótipos de cada indivíduo.

Todas as sondas utilizadas foram validadas pela empresa ThermoFisher, existindo um protocolo pré-estabelecido. As reações foram feitas com 15µL de Master Mix, 0,75µL de sonda TaqMan específica para cada variante estudada, 20 – 30 ng de DNA e água ultrapura suficiente para atingir um volume reacional de 25µL. Toda reação inclui um controle negativo, que contém todos os reagentes da reação de PCR, sem o acréscimo de DNA. Este controle é utilizado para garantir que não houve nenhuma contaminação com qualquer DNA. As reações foram feitas no equipamento *QuantStudio 6 Real-Time PCR* e as condições para a amplificação são: 60°C por 1 minuto, 95° por 10 minutos, de 95° por 15 segundos, 60° por 1:30 minuto, durante 50 ciclos.

4.2.3.1 Curvas de Padronização

Foram adquiridas quatro sondas *TaqMan*® para PCR em tempo real (Quadro 2): *COMT* (rs4680), *BDNF* (rs6265), *PLCG2* (rs72824905) e *TREM2* (rs143332484). Depois de estabelecida a padronização dos testes iniciais foram realizadas as análises dos genes *COMT* e *BDNF*, *PLCG2* e *TREM2*, conforme figuras 8, 9, 10 e 11.

Gene	SNP	Sonda
<i>COMT</i>	rs4680	CCAGCGGATGGTGGATTTGCTGGC[A/G]TGAAGGACAAGGTGTGCATGCCTGA
<i>BDNF</i>	rs6265	TCCTCATCCAACAGCTCTTCTATCA[C/T]GTGTTTCGAAAGTGTGAGCCAATGAT
<i>PLCG2</i>	rs72824905	CCTCTCTTTGCGGCCAGGATATAC[C/G]CCCTACAGAACTACATTTTGGGGAG
<i>TREM2</i>	rs143332484	CCACAAGTTGTGCGTGCTGACCACA[C/T]GCTGGCATGGGCCCTTCTCTCCAG

Quadro 2. Desenhos das sondas utilizadas para genotipagem.

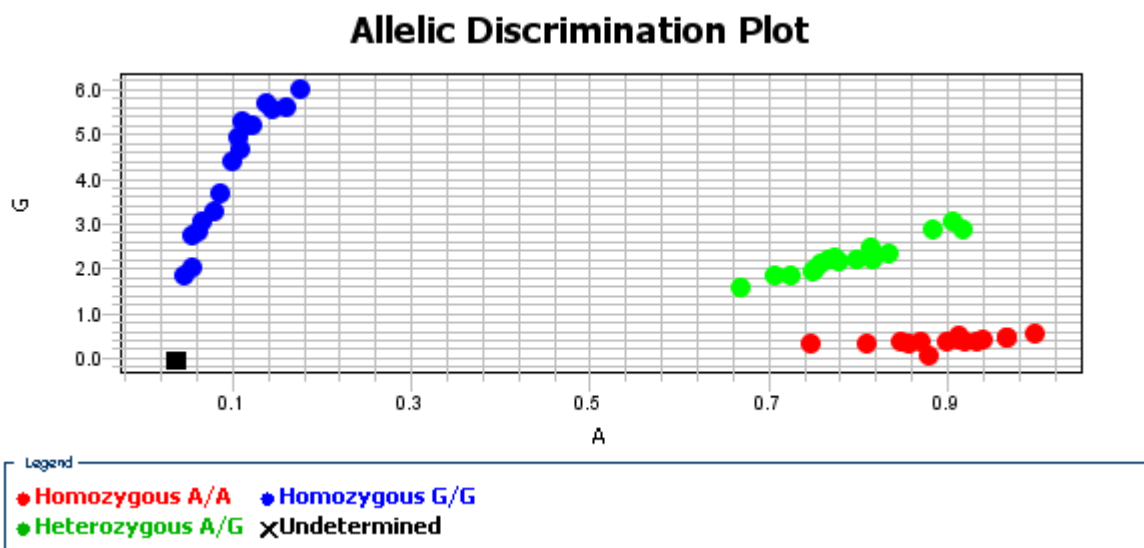


Figura 8. Gráfico de discriminação alélica do polimorfismo rs4680 do gene *COMT*. O eixo Y indica a intensidade de luz emitida pela fluorescência FAM, que está ligado a uma sonda que anela o alelo G. O eixo X indica o aumento da fluorescência VIC que está ligado a uma sonda que anela o alelo A. Os círculos azuis indicam indivíduos homozigotos para o alelo G; os círculos vermelhos indicam indivíduos homozigotos para o alelo A; os círculos verdes indicam indivíduos heterozigotos; o quadrado preto é o controle negativo da placa em questão.

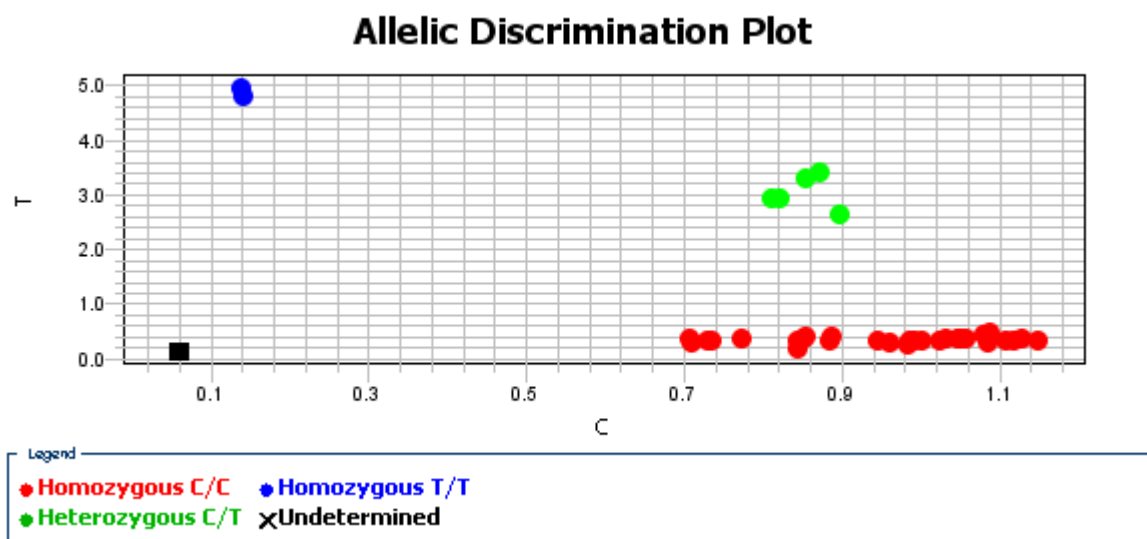


Figura 9. Gráfico de discriminação alélica do polimorfismo rs6265 do gene *BDNF*. O eixo Y indica a intensidade de luz emitida pela fluorescência FAM, que está ligado a uma sonda que anela o alelo T. O eixo X indica o aumento da fluorescência VIC que está ligado a uma sonda que anela o alelo C. Os círculos azuis indicam indivíduos homozigotos para o alelo T; os círculos vermelhos indicam indivíduos homozigotos para o alelo C; os círculos verdes indicam indivíduos heterozigotos; o quadrado preto é o controle negativo da placa em questão.

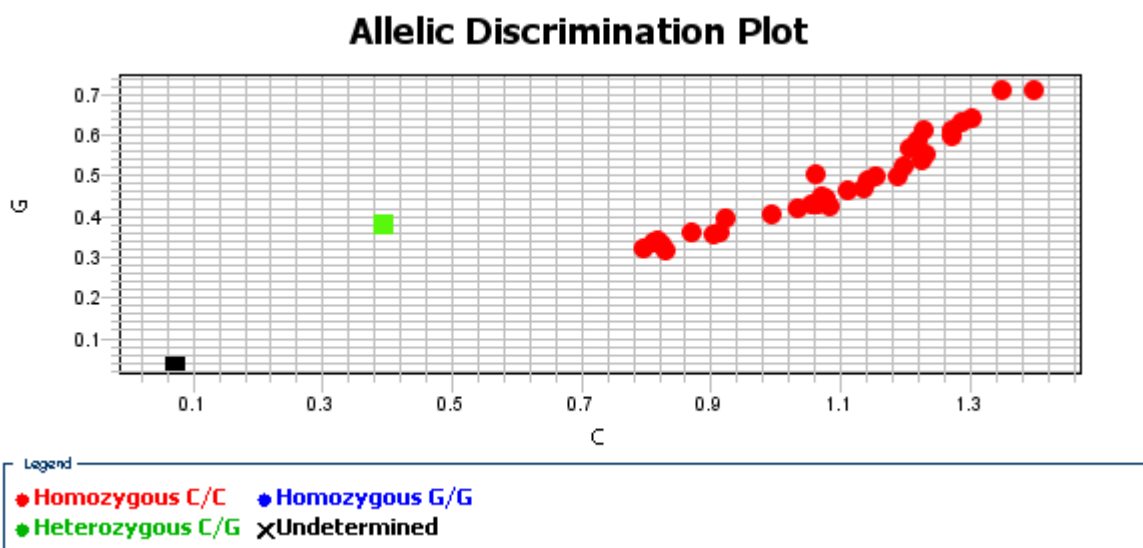


Figura 10. Gráfico de discriminação alélica do polimorfismo rs72824905 do gene *PLCG2*. O eixo Y indica a intensidade de luz emitida pela fluorescência FAM, que está ligado a uma sonda que anela o alelo G. O eixo X indica o aumento da fluorescência VIC que está ligado a uma sonda que anela o alelo C. Os círculos vermelhos indicam indivíduos homozigotos para o alelo C; o quadrado verde indica indivíduos heterozigotos; o quadrado preto é o controle negativo da placa em questão.

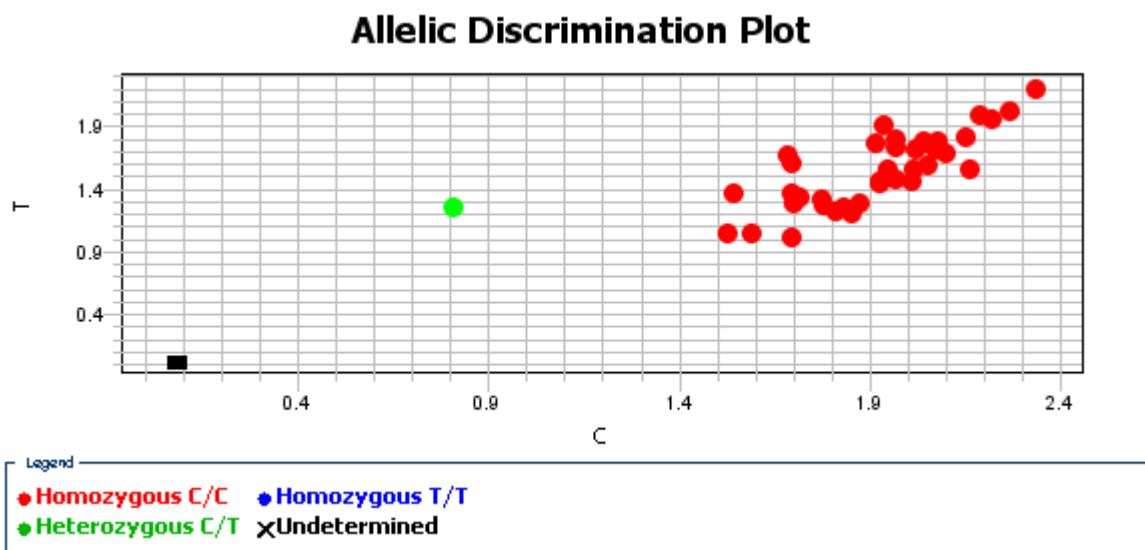


Figura 11. Gráfico de discriminação alélica do polimorfismo rs143332484 do gene *TREM2*. O eixo Y indica a intensidade de luz emitida pela fluorescência FAM, que está ligado a uma sonda que anela o alelo T. O eixo X indica o aumento da fluorescência VIC que está ligado a uma sonda que anela o alelo C. Os círculos vermelhos indicam indivíduos homozigotos para o alelo C; o círculo verde indica indivíduos heterozigotos; o quadrado preto é o controle negativo da placa em questão.

4.2.4 Sequenciamento

A metodologia que foi empregada para rastrear mutações nos éxons 5, 7 e 8 no gene *PSEN1* é o sequenciamento automático, utilizando a plataforma de redes tecnológicas PDTIS (Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde). Este procedimento baseia-se na adição de didesoxinucleotídeo trifosfato, ou ddNTP, na posição 3' da fita em crescimento. Os ddNTP, diferentemente dos desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP), não possuem uma hidroxila na posição 3' de sua molécula, interrompendo a inserção de outros nucleotídeos a partir dele. Com isso, cada reação é parcial, pois a terminação acabará em um nucleotídeo aleatório, gerando uma população de fragmentos de diferentes tamanhos. Cada ddNTP é marcado com um fluoróforo que emite energia em comprimentos de onda diferentes, possibilitando que seja detectado. Portanto, as fitas terminadas em A, T, G ou C vão emitir cores diferentes quando excitadas com luz de um determinado comprimento de onda. A fluorescência emitida é registrada por um sistema de microcâmeras sensoriais, que por sua vez transforma o sinal num gráfico, conhecido como eletroferograma.

O sequenciamento do DNA é dividido em duas etapas principais. Primeiramente, as amostras são submetidas a PCR convencional para amplificar a região alvo. Nesta reação, foi utilizado DNA (50 – 100ng), oligonucleotídeos, a DNA polimerase, dNTP, tampão da enzima, $MgCl_2$ e água MilliQ. Posteriormente, estes foram levados ao termociclador e os fragmentos obtidos foram submetidos a um gel de agarose a 1,5% para avaliar a amplificação da PCR. Esses produtos de PCR foram purificados pelo Kit Chargeswitch Pro-Pcr (Invitrogen) e novamente submetidos a um gel de agarose 2,0% usando marcador Low mass para uma quantificação relativa.

Após estas etapas, foi realizada a reação de sequenciamento, utilizando 3-10 ng do DNA amplificado purificado, 3,2 pmoles do iniciador (*forward* e *reverse*), 1 µL de Big Dye terminator v3.1 (Applied Biosystems), 1,5 µL Tampão 5x (Applied Biosystems) e água ultrapura suficiente para 7,5 µL. A reação de sequenciamento é conduzida no termociclador, com as seguintes condições de ciclagem: aquecimento a 94°C por 10 segundos, seguido por 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos, sendo realizadas 40 repetições desses ciclos (protocolo estabelecido pela plataforma de sequenciamento).

Os produtos da reação anterior passaram pelo processo de precipitação, que consiste na adição de 30 μ L (3x volume) de Isopropanol 75% (MERCK) para cada amostra. O material foi submetido a uma agitação no vortex por 10 segundos, repouso por 15 minutos (sob o abrigo de luz) e centrifugação a 4.000 rpm por 15 minutos. O material sobrenadante foi descartado e adicionado 50 μ L (5x volume) de Etanol 75% (MERCK) em cada amostra. Este material foi centrifugado por 15 minutos a 4.000 rpm e o sobrenadante descartado novamente. Para finalizar, foi colocado no termociclador aquecido a 60°C por 10 minutos. Posteriormente, este material foi encaminhado para a Plataforma de Sequenciamento de DNA RPT01A, para que fossem realizados os passos de desnaturação usando formamida e análise no sequenciador automático 3730XL (Life Technologies).

Todos os oligonucleotídeos usados para o sequenciamento foram desenhados no Laboratório de Genética Humana (Quadro 3). A sequência do gene usada para desenhar os “primers” foi obtida no banco de dados do NCBI (*The National Center for Biotchnology Information*) e os oligonucleotídeos foram desenhados pelo programa Primer3Plus e sua viabilidade foi analisada pelo programa PCR Primer Stats.

PSEN1	Éxon 5	F 5' AGATGGAGCCAGTGTCTGCT 3'	Tm: 60,0	Pb: 20
		R 5' CTGTGACAAGAATACCCAACCA 3'	Tm: 59,9	Pb: 22
	Éxon 7	F 5' AAATGAGACCCTGGCTCAA 3'	Tm: 59,7	Pb: 20
		R 5' TGGGATGTACACGTTACCATTT 3'	Tm: 59,1	Pb: 22
	Éxon 8	F 5' CCTTCGTTAATTCCTCCCTACC 3'	Tm: 60,2	Pb: 22
		R 5' CCTTGAGCTTGCCCTAATCA 3'	Tm: 60,3	Pb: 20

Quadro 3. Desenhos dos primers utilizados para o sequenciamento de sanger.

4.3. Análise Estatística

A amostra estudada foi dividida em pacientes com DA (casos) e indivíduos saudáveis (controles). As frequências genotípicas e alélicas foram obtidas através da contagem gênica. Avaliamos se as frequências genotípicas dos grupos casos e controles estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg utilizando o teste do qui-quadrado. Para finalizar, investigamos se havia uma associação do genótipo e alelos dos polimorfismos estudados com a DA através do teste do qui-quadrado. No intuito de aprofundar as análises, realizamos os testes em modelo dominante e

recessivo, bem como estabelecemos o *Odds Ratio* das análises em questão. Todas as análises foram realizadas através do programa SPSS V.16, sendo as inferências estatísticas feitas ao nível de 5% de significância.

5 RESULTADOS

5.1 Amostras

A coleta realizada reúne 332 indivíduos com idade superior a 55 anos, sendo todos participantes do Programa de Atenção Integrada da Saúde do Idoso do Município de Duque de Caxias e do Instituto de Psiquiatria da Universidade Federal do Rio de Janeiro Deolindo Couto. Esta amostra é estratificada em pacientes (n=74) e controles (n=258). A tabela 1 a seguir mostra algumas características gerais da amostra total.

Tabela 1. Características gerais da amostra total.

Tabela 1: Características gerais da amostra total			
	Masculino (%)	Feminino (%)	Total
Controle/paciente			
Controle	49 (66,21)	209 (81,0)	258 (77,71)
Paciente	25 (33,79)	49 (19,0)	74 (22,29)
Total	74	258	332
Média das idades			
Controle	74,24	72,31	72,68
Paciente	77,32	76,16	77,62
Total	75,28	73,03	73,52
CDR			
0	22 (30,33)	83 (32,19)	105
0,5	27 (34,09)	126 (48,84)	153
1	15 (20,87)	25 (9,68)	40
2	7 (10,05)	18 (6,97)	25
3	3 (4,65)	6 (2,32)	9
Total	74	258	332

5.2 Gene *COMT*

No gene *COMT*, estudamos o polimorfismo Val158Met (rs4680) através da técnica de PCR em tempo real (Tabela 2). Nossas análises preliminares mostraram que o rs4680 se encontra em equilíbrio de Hardy-Weinberg. O grupo controle apresentou o valor de $\chi^2 = 0,999$ ($p=0,317$) e o grupo de pacientes o valor de $\chi^2 = 0,927$ ($p=0,335$), indicando que a amostra não apresenta desvios significantes do equilíbrio genético.

Levando como base o fato que as amostras apresentavam diferenças entre elas, verificou-se, através do teste da partição do qui-quadrado, se algum genótipo é mais frequente dentro do grupo de pacientes e controles. Quando comparados ao genótipo GG, o genótipo GA apresentou um $\chi^2 = 1,916$ (OR=1,566; $p=0,166$), mostrando-se não significante. Contudo, quando cruzado com o genótipo AA, obteve-se um $\chi^2 = 6,198$ (OR=2,726; $p=0,013$), revelando que a frequência do genótipo AA é maior 2,726 vezes maior no grupo dos pacientes quando comparado aos controles.

Em seguida, utilizando os testes de modelos dominante e recessivo, foi verificado se apenas um alelo - dentro do genótipo apresentado - seria suficiente para o desenvolvimento da DA. Nossos resultados mostraram que o polimorfismo está associado à doença através do modelo recessivo $\chi^2 = 4,428$ (OR=2,082; $p=0,034$), indicando que apenas apresentando ambos os alelos mutados, ou seja, o genótipo AA, o paciente conteria a condição necessária para o desenvolvimento da doença. Finalmente, realizamos as análises alélicas e observamos que o alelo mutado A é um fator de risco para o desenvolvimento da DA $\chi^2 = 6,104$ (OR=1,643; $p=0,013$).

Tabela 2. Frequências genotípicas, alélicas e associação do polimorfismo rs4680 do gene *COMT* relacionado à doença de Alzheimer.

Polimorfismo	Caso n=68 (%)	Controle n=233 (%)	OR (95% CI)	p	χ^2
rs4680					
H-W					
Caso	-	-	-	0.335	0.927
Controle	-	-	-	0.317	0.999
Genótipo					
GG	18 (26.50)	92 (39.48)	1.00 (Ref.)	-	-
GA	34 (50.00)	111 (47.60)	1.566 (0.830 - 2.953)	0.166	1.916
AA	16 (23.50)	30 (12.80)	2.726 (1.238 - 6.003)	0.013	6.198
Modelo Dominante					
GG	18 (26.47)	92 (39.48)	1.00 (Ref.)	-	-
GA+AA	50 (73.53)	141 (60.52)	1.812 (0.995 - 3.300)	0.052	3.782
Modelo Recessivo					
GG+GA	52 (76.48)	203 (87.13)	1.00 (Ref.)	-	-
AA	16 (23.52)	30 (12.87)	2.082 (1.056 - 4.105)	0.034	4.482
Alelo					
G	70 (51.47)	295 (63.30)	1.00 (Ref.)	-	-
A	66 (48.53)	171 (36.70)	1.643 (1.108 - 2.436)	0.013	6.104

5.3 Gene *BDNF*

No gene *BDNF*, estudamos o polimorfismo Val66Met (rs6265) através da técnica de PCR em tempo real. As análises estatísticas averiguaram através do equilíbrio de Hardy-Weinberg se algum fator externo estaria influenciando no genótipo das amostras. O presente estudo obteve o valor de $\chi^2 = 3.757$ ($p=0,052$) para o grupo paciente e $\chi^2 = 4.180$ ($p=0,040$) para o grupo controle, indicando que os controles apresentam significantes desvios no equilíbrio genético.

Apesar da amostra de controles estarem em desequilíbrio de Hardy-Weinberg, realizamos as análises de associação da DA com o polimorfismo rs6265. No entanto, nenhum de nossos resultados mostrou significância estatística (Tabela 3).

Tabela 3. Frequências genotípicas, alélicas e associação do polimorfismo rs6265 do gene *BDNF* relacionado à doença de Alzheimer.

Polimorfismo	Caso n=69 (%)	Controle n=239 (%)	OR (95% CI)	p	χ^2
rs6265					
H-W					
Caso	-	-	-	0.052	3.757
Controle	-	-	-	0.04	4.18
Genótipo					
CC	45 (65.21)	160 (66.94)	1.00 (Ref.)	-	-
CT	18 (26.08)	65 (27.19)	0.985 (0.531 - 1.827)	0.326	0.961
TT	6 (8.71)	14 (5.87)	1.524 (0.554 - 4.192)	0.666	0.415
Modelo Dominante					
CC	45 (65.21)	160 (66.94)	1.00 (Ref.)	-	-
CT+TT	24 (34.79)	79 (33.06)	1.080 (0.615 - 1.899)	0.072	0.789
Modelo Recessivo					
CC+CT	63 (91.29)	225 (94.14)	1.00 (Ref.)	-	-
TT	6 (8.71)	14 (5.86)	1.531 (0.565 - 4.145)	0.701	0.402
Alelo					
C	108 (78.26)	385 (80.54)	1.00 (Ref.)	-	-
T	30 (21.74)	93 (19.46)	1.128 (0.734 - 1.735)	0.301	0.583

Estudos anteriores mostraram que em algumas populações o rs6265 não foi associado à DA quando analisado o sexo masculino e feminino juntos. Todavia, quando estratificado por sexo, indivíduos do grupo feminino tiveram maior tendência à DA (Fukumoto *et al.*, 2010). Desta forma procedemos à mesma estratificação, mas na população em análise não houve correlação do rs6265 ao desenvolvimento da DA em pacientes do sexo feminino ou masculino.

5.4 Genes *PLCG2* e *TREM2*

Analizamos através da técnica de PCR em tempo real mais dois polimorfismos que recentemente estão sendo associados com a DA: o rs72824905, localizado no gene *PLCG2*, e o rs143332484, no gene *TREM2*. Obtivemos, conforme tabela abaixo, os seguintes resultados para essas sondas.

Tabela 4. Genótipos e alelos das sondas rs72824905 (*PLCG2*) e rs143332484 (*TREM2*) na amostra total.

Gene <i>PLCG2</i>	
rs72824905	
Genótipos	
CC	299
CG	3
GG	0
Alelos	
C	601
G	3
Gene <i>TREM2</i>	
rs143332484	
Genótipos	
CC	283
CT	2
TT	0
Alelos	
C	568
T	2

Conforme consta na tabela, as mutações em questão se mostraram bastante raras, o que impossibilitou uma análise estatística para melhor compreender os efeitos que as mesmas poderiam estar causando em nossa população. Contudo, procedemos à análise da frequência genotípica e alélica nos pacientes e controles de nossa amostra (Gráfico 2 e 3).

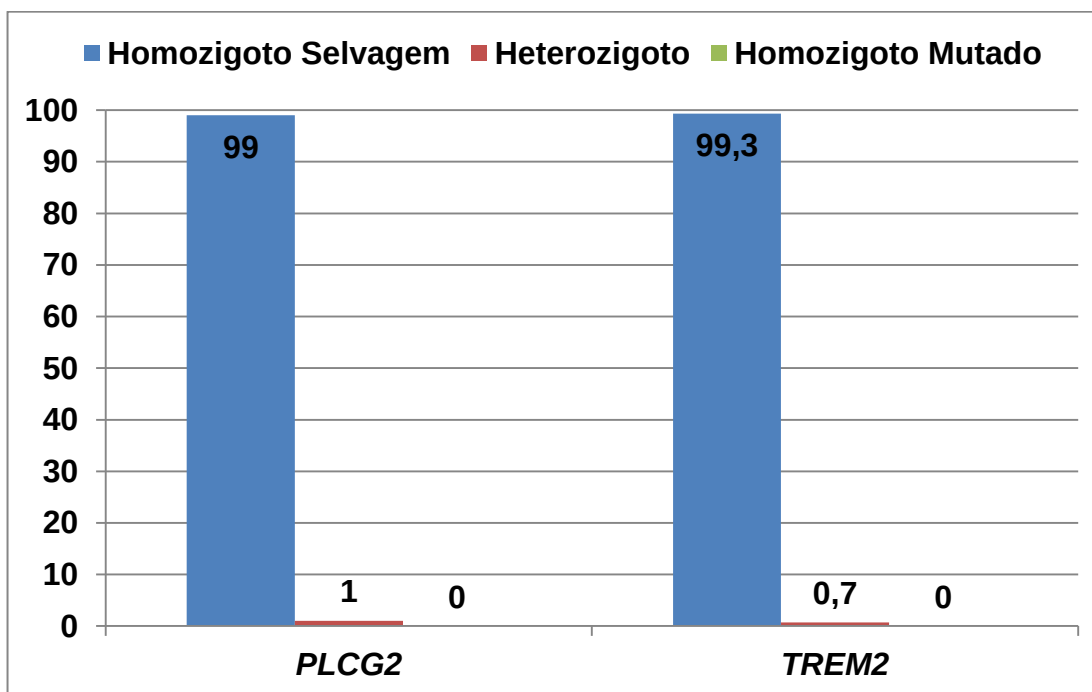


Gráfico 2. Frequência genotípica dos genes *PLCG2* e *TREM2* na amostra total.

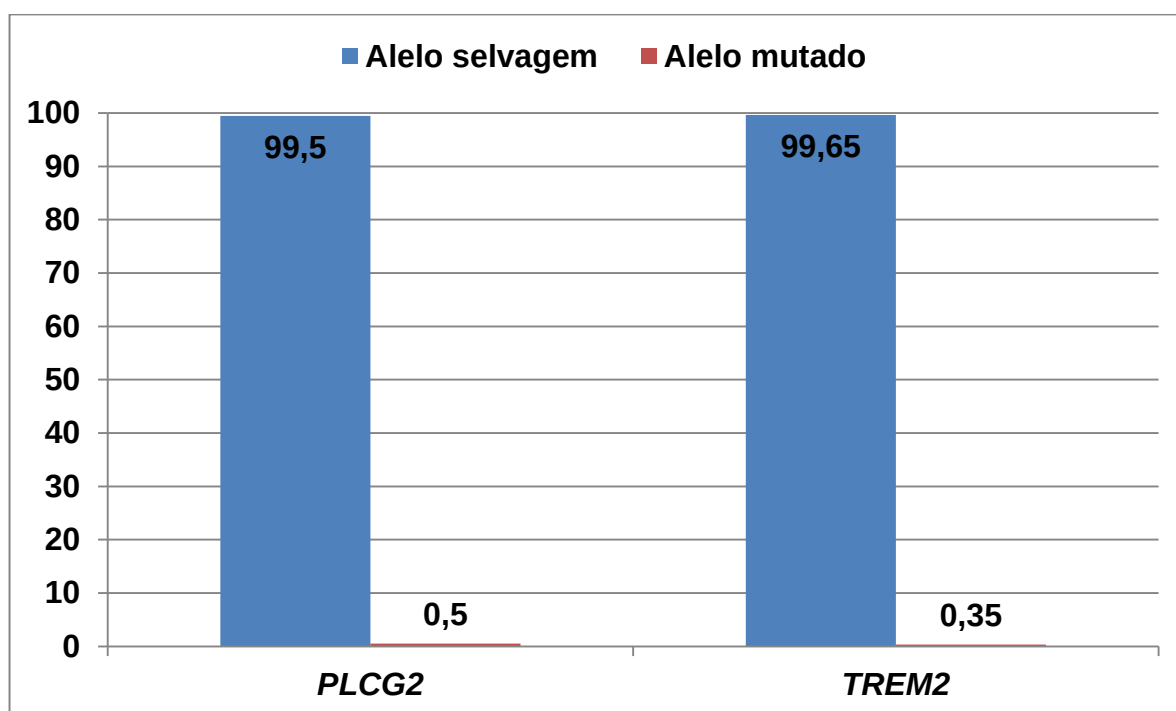


Gráfico 3. Frequência alélica dos genes *PLCG2* e *TREM2* na amostra total.

5.5 Gene *PSEN1*

O gene *PSEN1* foi estudado através da técnica do sequenciamento automático de Sanger. Devido à alta prevalência de mutações patogênicas nos éxons 5, 7 e 8, realizamos um rastreamento dessas regiões, assim como das junções íntron-éxon de nossos pacientes. A realização dessa técnica requer um PCR inicial para a amplificação de cada região de interesse e posterior desses produtos da PCR. Após a purificação o material foi encaminhado para a plataforma de sequenciamento de DNA RPT01A para que pudessem ser realizados os passos de desnaturação e posterior análise no sequenciador automático (Thermofisher).

Todos os fragmentos selecionados para o sequenciamento exibiram o tamanho esperado, não sendo observadas inserções e deleções. Nas análises das sequências não encontramos nenhuma mutação causal ou não causal nas regiões codificantes pesquisadas. Contudo, no intron 7-8, o polimorfismo rs165932 se mostrou bastante presente. Esta mutação é causada pela troca de um alelo T por G no íntron 7-8 (Ensembl, 2019). Baseado na análise dos eletroferogramas (Figura 12), observamos em nossa amostra 29 indivíduos homozigotos selvagens (TT), 36 heterozigotos (TG) e 3 homozigotos mutados (GG) (Tabela 5). Obtivemos 6 falhas durante o processo de sequenciamento dos 74 pacientes estudados. Posteriormente, submetemos nossos resultados às análises das frequências genotípicas e alélicas de nossos pacientes. O genótipo TT esteve presente em 42,65% dos pacientes, o TG em 52,94% e o GG em 4,41% (Gráfico 4). O alelo selvagem foi encontrado em 69,12% dos pacientes, enquanto o mutado esteve presente em 30,88% (Gráfico 5).

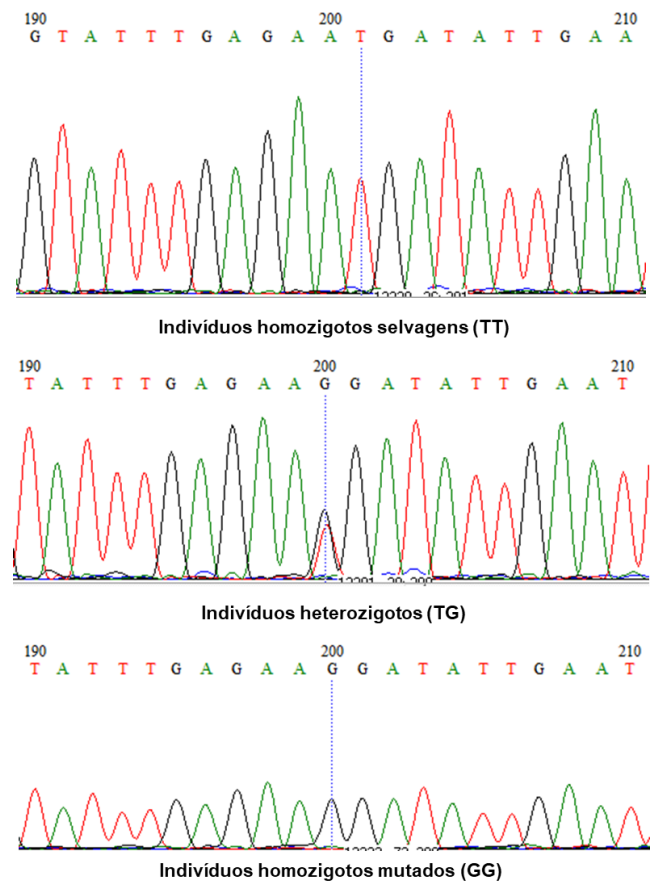


Figura 12. Análise dos eletroferogramas na amostra de pacientes estudada.

Tabela 5. Genótipos e alelos do rs165932, no gene *PSEN1*, na amostra de pacientes.

Gene <i>PSEN1</i>	
rs165932	
Genótipos	
TT	29
TG	36
GG	3
Alelos	
T	94
G	42

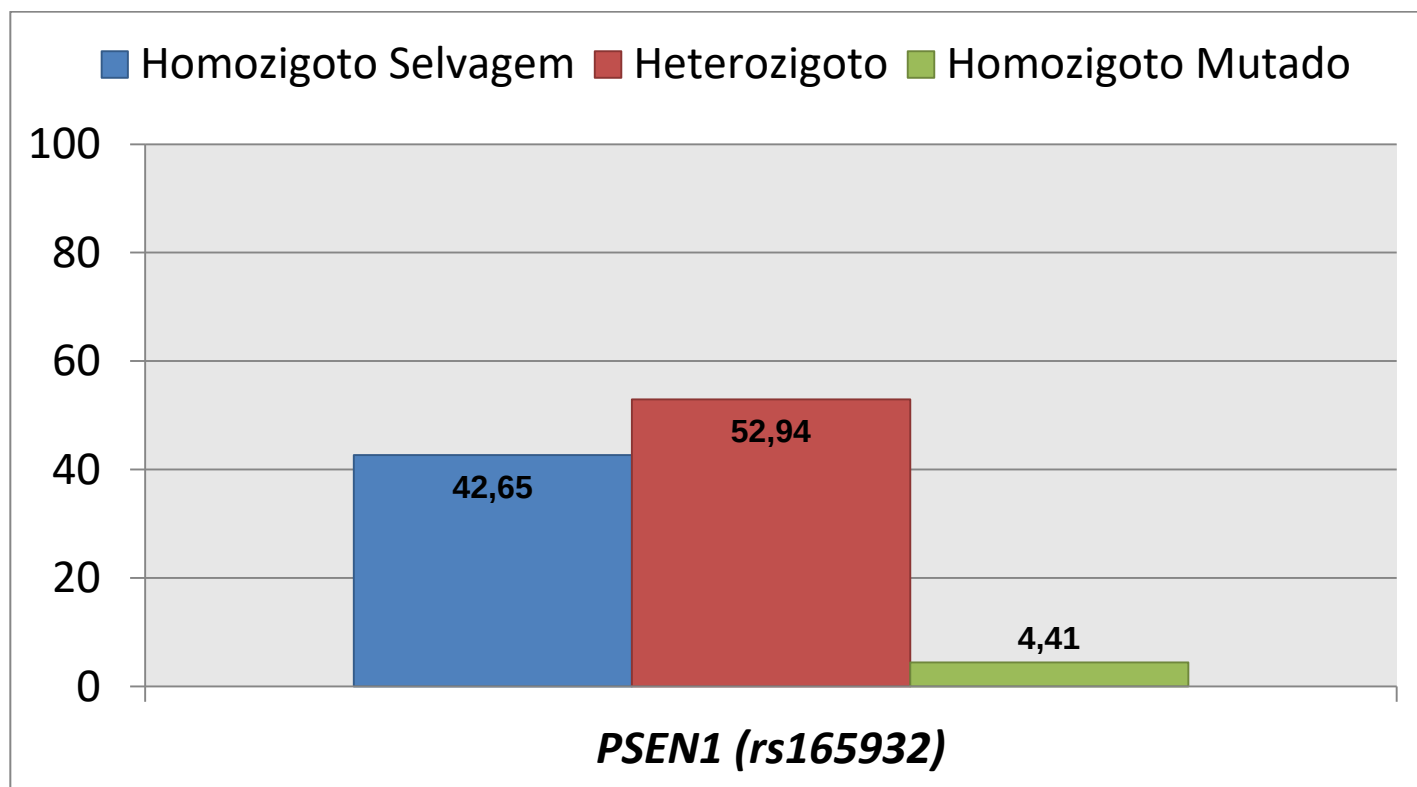


Gráfico 4. Frequência genotípica do rs165932, no gene *PSEN1*, na amostra de pacientes.

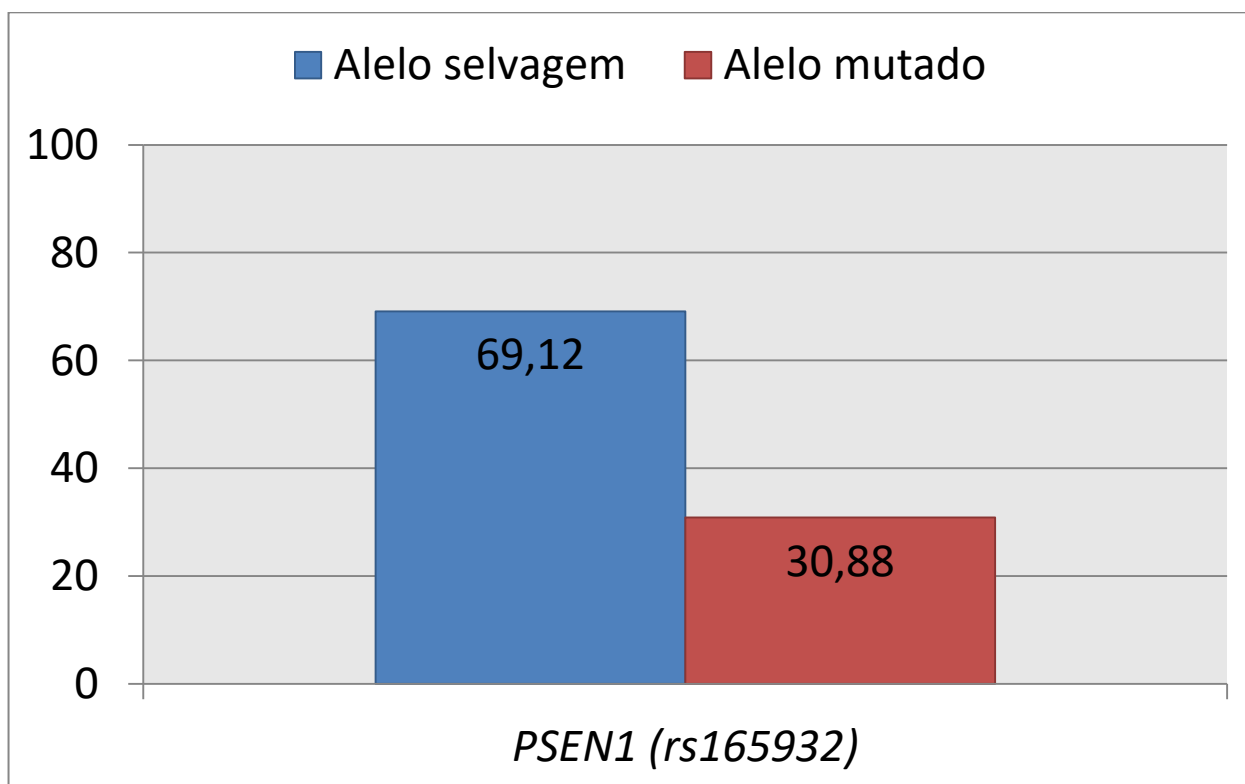


Gráfico 5. Frequência alélica do rs165932, no gene *PSEN1*, na amostra de pacientes.

6 DISCUSSÃO

A doença de Alzheimer é a forma mais comum de demência que afeta milhões de pessoas em todo o mundo. Placas senis formadas por polipeptídeos β -amiloide ($A\beta$) e emaranhados neurofibrilares são os mecanismos mais conhecidos e aceitos. Todavia, a comunidade científica ainda busca elucidar como esses dois mecanismos interagem e levam ao desenvolvimento da DA. Mutações e polimorfismos em diversos genes podem nos fornecer informações sobre mecanismos moleculares, vias bioquímicas envolvidas na patogênese da DA e conduzir a valiosos alvos de drogas que podem ser usados no diagnóstico e tratamento.

6.1 Gene *COMT*

No presente estudo, investigamos a influência do polimorfismo rs4680 relacionado à DA em brasileiros. Nossos resultados indicam que a variante genética apresenta uma distribuição diferente entre os grupos, sugerindo que o alelo A representa um fator de risco e está associado à doença. Lee e Song (2014), através de uma meta-análise, mostrou que o alelo G era um fator de proteção à DA em asiáticos. Outro grupo (Ji *et al.*, 2014) não encontrou diferenças significativas entre os indivíduos asiáticos com DA e controles. Contudo, neste mesmo estudo a frequência do alelo mutado foi maior no grupo de pacientes do que nos controles. Ainda neste mesmo trabalho, o autor subdividiu os grupos com presença e ausência do alelo APOE ϵ 4. Os resultados mostraram que o alelo A, do gene *COMT*, foi um fator de risco independente no subgrupo sem a presença do alelo APOE ϵ 4. Todavia, outros estudos não observaram a associação do rs4680 com a DA em indivíduos asiáticos (Zhou *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2015).

Diferentemente do apontado para a população asiática, alguns autores sugerem que populações como italianas e bascas apresentam uma associação do alelo G do polimorfismo rs4680 com o desenvolvimento da DA por meio de um efeito sinérgico com o alelo APOE ϵ 4. (Lanni *et al.*, 2012; Martinez *et al.*, 2009). Quando analisada a população em geral, outras pesquisas sugerem que não há ligação direta entre o Val158Met e a suscetibilidade à DA (Yan *et al.*, 2016; Lanni *et al.*, 2012; Corbo *et al.*, 2014).

As discrepâncias entre essas populações talvez possam ser explicadas por diferenças na frequência do alelo A. A proporção desse alelo em asiáticos é menor do que em pessoas de descendência européia, por exemplo (Kauhanen *et al.*, 2000, Nakamura *et al.*, 2001). Vale salientar que vários estudos não encontraram associações positivas do polimorfismo *COMT* rs4680 e risco de DA, mas foram observados os efeitos sinérgicos entre o genótipo rs4680 e o alelo *APOE*ε4 (Ji *et al.*, 2014).

6.2 Gene *BDNF*

O gene *BDNF* codifica uma proteína que é um membro da família dos fatores neurotróficos (Maisonpierre *et al.*, 1991) e desempenha um papel fundamental no sistema nervoso central, facilitando a formação da memória e sua potenciação a longo prazo (Kemppainen *et al.*, 2012; Rex *et al.*, 2007). A superexpressão da proteína *BDNF* aumenta o aprendizado e a memória (Koponen *et al.*, 2004), enquanto sua diminuição resulta em uma memória espacial declinada (Minichiello, 2009). A incapacidade funcional desta proteína está associado à neuropsiquiatria (Angelucci *et al.*, 2005; Autry e Monteggia, 2012; Li *et al.*, 2016) e neurodegeneração (Zuccato e Cattaneo, 2009), desempenhando, desta forma, um papel importante na progressão da DA (Scacchi *et al.*, 2009; Serretti *et al.*, 2007). Alguns estudos, através da avaliação do nível de expressão do *BDNF*, indicam que ela está menos presente em pacientes com DA, quando comparados a indivíduos saudáveis (Connor *et al.*, 1997; Hock *et al.*, 2000; Peng *et al.*, 2005).

Este importante papel do *BDNF* na sobrevivência e funcionalidade neuronal têm levado pesquisadores a realizar investigações moleculares no intuito de associar geneticamente mutações nesse gene com a DA. Um polimorfismo muito estudado é o rs6265, sendo sua associação com a DA relatada em vários estudos (Feher *et al.*, 2009; Fukumoto *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2007; Tsai *et al.*, 2006). Contudo, diversos outros estudos falharam em demonstrar uma associação significativa (Boiocchi *et al.*, 2013; Borroni *et al.*, 2012; Sonali *et al.*, 2013; Vieira *et al.*, 2015). Em nosso estudo, não pudemos observar esta associação do rs6265 com a nossa amostra, corroborando alguns resultados encontrados na literatura.

Existe uma regulação do *BDNF* feita pelo estrogênio (Scharfman e MacLusky, 2006; Solum e Handa, 2002), indicando uma influência específica no sexo feminino na doença de

Parkinson (Foltynie *et al.*, 2005) e uma maior prevalência da DA em pessoas desse gênero (Mielke *et al.*, 2014; Vina e Lloret, 2010). Estes resultados levam a comunidade científica a supor que haja uma associação específica de gênero deste gene com DA (Chen *et al.*, 2014; Fukumoto *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2014). Nota-se que diversos autores vêm estratificando suas amostras pelo sexo e submetendo seus resultados à análise estatística. Em nossa amostra procedemos a mesma estratificação, não conseguindo, contudo, correlacionar o rs6265 com ambos os gêneros.

6.3 Genes *PLCG2* e *TREM2*

As variantes rs72824905 (*PLCG2*) e rs143332484 (*TREM2*) se mostram uma novidade quando se trata de DA. Estudos sugerem que estas variantes raras de codificação nos genes *PLCG2* e *TREM2* também podem modular a suscetibilidade à DA. Apenas recentemente a associação da variante rs72824905 com a DA vem sendo estudada. A capacidade protetiva desta mutação é listada em poucos trabalhos na literatura (Conway *et al.*, 2018), corroborando a importância de maiores estudos.

A mutação rs143332484 é uma mutação *missense* caracterizada pela troca de uma arginina por uma histidina no aa 62 da proteína (p.R62H). Descobertas no *TREM2* puderam ser replicadas em povos Caucasianos (Sims *et al.*, 2017) e afro-americanos (Jin *et al.*, 2015), associando-as à DA. No entanto, a relação deste gene a DA não pôde ser repetida em algumas populações. Uma possibilidade para essas divergências pode se encontrar no *background* genético das diferentes etnias, pois, diferentemente de caucasianos e afro-americanos, populações latinas e asiáticas apresentam uma frequência extremamente baixa do alelo e necessitam de um grande espectro amostral (Miyashita *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2015; Pottier *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2014; Guerreiro *et al.*, 2013)

A frequência do alelo mutado também varia de acordo com a população estudada. O rs72824905, no gene *PLCG2*, em alguns estudos apresenta uma frequência de 0,4% em pacientes e 0,6% em controles (Dalmaso *et al.*, 2019). Outros estudos sugeriram uma frequência deste mesmo alelo de 0,59% para pacientes e 0,93% para controles (Sims *et al.*, 2017). O rs143332484, no gene *TREM2*, apresenta uma frequência alélica de 1,43% para pacientes e 0,89% em controles (Sims *et al.*, 2017). Em nossos resultados, ambas as

frequências do alelo mutado na populacional mundial se mostraram superiores, quando comparadas à população estudada (tabela 6).

Tabela 6. Comparação da frequência do alelo mutado dos genes *PLCG2* e *TREM2* na população mundial e na amostra de pacientes estudada.

Polimorfismo	Frequência do alelo	
	Mundial	Presente estudo
rs72824905	1%	0,50%
rs143332484	1%	0,35%

Em nosso estudo, devido à pequena quantidade amostral e à baixa frequência de ambas as mutações, não foi possível construir uma análise estatística de nossa amostra. Dessa forma, sugerimos que essas variações genéticas devem ser replicadas em um estudo com maior tamanho amostral.

6.4 Gene *PSEN1*

Nos últimos anos, diversos genes estão sendo associados às doenças neurodegenerativas, dentre elas a DA. No intuito de analisar uma possível influência de mutações e polimorfismos do gene *PSEN1*, o presente estudo realizou um rastreamento dos éxons 5, 7 e 8 e suas respectivas junções íntron-éxon. Nossas análises não identificaram mutações na região codificante da amostra. Todavia, a junção íntron-éxon 7-8 apresentou polimorfismos já descritos pela literatura (rs165932). A mutação identificada mostrou-se polimórfica na população estudada, tendo uma frequência relativamente menor quando comparada à população mundial (tabela 7). O polimorfismo em questão foi listado em casos familiares e esporádicos, com uma frequência que varia de acordo com a etnia (Abdala *et al.*, 2017) e estudos funcionais o caracterizaram clinicamente como um alelo benigno (Sherry *et al.*, 2001). Enquanto alguns autores associaram estatisticamente essa variante à DA, como em coortes americanas, europeias e japonesas (Tilley *et al.*, 1999; Wragg *et al.*, 1996; Matsushita *et al.*, 1997; Jia *et al.*, 2006), outros não encontraram tal relação (Rassas *et al.*, 2013; Romas *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2000). Esse polimorfismo tem sido amplamente estudado em associação à

doença de Alzheimer em algumas etnias, como a caucasiana e a asiática (Tysoe *et al.*, 1997; Hu *et al.*, 1998), sendo contudo pouco explorado em populações mistas como a brasileira.

Tabela 7. Comparação da frequência alélica do rs165932 na população mundial e na amostra de pacientes estudada.

Polimorfismo	Frequência	
	Mundial	Presente estudo
rs165942	33%	30,88%

Até o momento, muitos estudos sobre a base da arquitetura genética da DA focaram na identificação de variantes em genes como *PSEN1* e *APOE*. Porém variantes nestes genes explicam apenas uma pequena proporção da variância fenotípica na DA. Nossos resultados suportam a ideia de que, além de mutações nesses genes, outras variantes dispersas pelo código genético podem aumentar substancialmente o risco de desenvolvimento de DA e explicar, em parte, sua complexa arquitetura genética. Não obstante, diversos estudos estão relatando o papel de diferentes genes no risco da DA, destacando a importância do acesso a esses fatores genéticos em populações com diferentes origens étnicas, incluindo a brasileira.

7 CONCLUSÃO

- Na análise genotípica realizada para o polimorfismo rs4680 do gene *COMT*, observou-se associação significativa deste polimorfismo com a Doença de Alzheimer.
- Para o polimorfismo rs6265 do gene *BDNF* foi observado um desequilíbrio no cálculo de HW para o grupo controle. Não foi observada diferença significativa na distribuição genotípica dos grupos controle e paciente deste polimorfismo.
- Na análise alélica, o polimorfismo rs4680, do gene *COMT*, mostrou-se significativamente associado com a Doença de Alzheimer.
- Não foi observada diferença significativa entre as frequências alélicas dos grupos Controle e Paciente no gene *BDNF* (rs6265).
- Os genes *PLCG2* e *TREM2* se mostraram raros em nossa amostra, indicando a necessidade de um maior tamanho amostral para desenvolver as análises estatísticas de ambos.
- As frequências genotípicas dos rs72824905, no gene *PLCG2* (CC=99%; CG=1%; GG=0%), e rs143332484, no gene *TREM2* (CC=99,3%; CT=0,7%; TT=0%) foram verificadas em nossa amostra total.
- As frequências alélicas dos rs72824905, no gene *PLCG2* (C=99,5%; G=0,5%), e rs143332484, no gene *TREM2* (C=99,65%; T=0,35%) foram verificadas em nossa amostra total.
- Não foi encontrada nenhuma mutação na região codificante do gene *PSEN1*.

- Em nossa amostra observamos a presença do polimorfismo rs165932 no íntron 7-8 do gene *PSEN1*.
- Efetuamos a frequência genotípica deste polimorfismo (rs165932) em nossa amostra de pacientes (TT=42,65%; TG=52,94%; GG=4,41%)
- Efetuamos a frequência alélica do polimorfismo (rs165932) em nossa amostra de pacientes (T=69,12%; G=30,88%)

Em nosso estudo demonstramos uma associação do gene *COMT* com a Doença de Alzheimer na amostra estudada, todavia outros estudos são necessários para uma melhor compreensão desta doença e sua relação genótipo-fenótipo na população brasileira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdala B.B., Dos Santos J.M., Gonçalves A.P., da Motta L.B., Laks J., de Borges M.B., Gonçalves Pimentel M.M., Santos-Rebouças C.B. (2017) Influence of low frequency PSEN1 variants on familial Alzheimer's disease risk in Brazil. *Neurosci Lett.* 13;653:341-345.
- Acx H., Chávez-Gutiérrez L., Serneels L., Lismont S., Benurwar M., Elad N., De Strooper B. (2013) Signature A β profiles are produced by different γ -secretase complexes. *J Biol Chem* 289(7):4346–4355
- Angelucci F., Brene S., Mathe A.A. (2005) BDNF in schizophrenia, depression and corresponding animal models. *Mol Psychiatry* 10, 345-352.
- Autry A.E., Monteggia L.M. (2012) Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders. *Pharmacol Rev* 64, 238-258.
- Bae YS, Lee HY, Jung YS, Lee M, Suh PG. (2017) Phospholipase Cgamma in toll-like receptor-mediated inflammation and innate immunity. *Adv Biol Regul.* 63:92–7.
- Bayer T.A., Wirths O., Majtenyi K. (2001) Key factors in Alzheimer's disease: b-amyloid precursor protein processing, metabolism and intraneuronal transport. *Brain Pathol* 11:1– 11.
- Beckett C, Nalivaeva NN, Belyaev ND, Turner AJ (2012) Nuclear signalling by membrane protein intracellular domains: the AICD enigma. *Cell Signal* 24(2):402–409.
- Binder D.K., Scharfman H.E. (2004) Brain-derived Neurotrophic Factor. *Growth Factors.* 22(3): 123–131.
- Bodner S.M., Berrettini W., Van Deerlin V., Bennett D.A., Wilson R.S., Trojanowski J.Q., Arnold S.E. (2015) Genetic Variation in the Brain Derived Neurotrophic Factor Gene in Alzheimer's Disease. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 134B(1):1-5
- Boiocchi C., Maggioli E., Zorzetto M., Sinforiani E., Cereda C., Ricevuti G., Cuccia M. (2013) Brain-derived neurotrophic factor gene variants and Alzheimer disease: an association study in an Alzheimer disease Italian population. *Rejuvenation Res* 16, 57-66.
- Borroni B., Agosti C., Archetti S., Costanzi C., Bonomi S., Ghianda D., Lenzi G.L., Caimi L., Di Luca M., Padovani A. (2004) Catechol-O-methyltransferase gene polymorphism is associated with risk of psychosis in Alzheimer disease. *Neuroscience Letters* 370, 127–129.
- Borroni B., Bianchi M., Premi E., Alberici A., Archetti S., Paghera B., Cerini C., Papetti A., Padovani A. (2012) The brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism is associated with reduced hippocampus perfusion in frontotemporal lobar degeneration. *J Alzheimers Dis* 31, 243-251.
- Broersen K, Rousseau F, Schymkowitz J (2010) The culprit behind amyloid beta peptide related neurotoxicity in Alzheimer's disease: oligomer size or conformation? *Alzheimers Res Ther* 2(4):12

Broussard J. I., Yang K., Levine A. T., Tsetsenis T., Jenson D., Cao F., Dani J. A. (2016). Dopamine regulates aversive contextual learning and associated in vivo synaptic plasticity in the hippocampus. *Cell reports*, 14(8), 1930-1939.

Bruno P. I., Jay L., Nunzio P. (2005) Pathophysiology of Alzheimer's Disease. *Neuroimaging Clinics of North America* 15(4):727-53

Butterfield DA, Swomley AM, Sultana R (2013) Amyloid “-peptide (1–42)-induced oxidative stress in Alzheimer disease: importance in disease pathogenesis and progression. *Antioxid Redox Signal* 19(8):823– 835. doi:10.1089/ars.2012.5027

Capetillo-Zarate E, Gracia L, Tampellini D, Gouras GK (2012) Intraneuronal accumulation, amyloid plaques, and synapse pathology in Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis* 10(1–4):56–59.

Chen J., Liang X., Li B., Jiang X., Xu Z. (2014) Gender-related association of brain-derived neurotrophic factor gene 196A/G polymorphism with Alzheimer's disease--a meta-analysis including 6854 cases and 6868 controls. *Int J Neurosci* 124, 724-733.

Chen Z.Y., Patel P.D., Sant G., Meng C.X., Teng K.K., Hempstead B.L. (2004) Variant brain-derived neurotrophic factor (*BDNF*) (Met66) alters the intracellular trafficking and activitydependent secretion of wild-type *BDNF* in neurosecretory cells and cortical neurons. *J Neurosci* 24:4401–11.

Cizas P, Budvytyte R, Morkuniene R, Moldovan R, Broccio M, Lösche M, Niaura G, Valincius G, Borutaite V. (2010) Size-dependent neurotoxicity of beta-amyloid oligomers. *Arch Biochem Biophys* 496(2):84–92

Cocco L., Follo M.Y., Manzoli L., Suh P.G. (2015) Phosphoinositide-specific phospholipase C in health and disease. *J Lipid Res.* 56(10):1853-60.

Connor B., Young D., Yan Q., Faull R.L.M., Synek B., Dragunow M. (1997) Brain-derived neurotrophic factor is reduced in Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res* 49, 71-81.

Conway O.J., Carrasquillo M.M., Wang X., Bredenberg J.M., Reddy J.S., Strickland S.L., *et al.* (2018) *ABI3* and *PLCG2* missense variants as risk factors for neurodegenerative diseases in Caucasians and African Americans. *Molecular Neurodegeneration*, 13(1).

Corbo R.M., Gambina G., Broggio E., Scarabino D., Scacchi R. (2014) Association study of two steroid biosynthesis genes (*COMT* and *CYP17*) with Alzheimer's disease in the Italian population. *Journal of the Neurological Sciences* 344 149–153

De Strooper B. (2003) Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin Generate an Active -Secretase Complex. *Neuron* 38, 9–12

De Strooper B., Beullens M., Contreras B., Craessaerts K., Moechars D., Bollen G., Fraser P., St George-Hyslop P., Van Leuven F. (1997) Postranslational modification, subcellular localization and membrane orientation of the Alzheimer's Disease associated presenilins, *J. Biol. Chem.* 272;3590–3598.

Di Fede G, Catania M, Morbin M, Rossi G, Suardi S, Mazzoleni G, Merlin M, Giovagnoli AR, Prioni S, Erbetta A, Falcone C, Gobbi M, Colombo L, Bastone A, Beeg M, Manzoni C, Francescucci B, Spagnoli A, Cantù L, Del Favero E, Levy E, Salmona M, Tagliavini F. A

- recessive mutation in the APP gene with dominant-negative effect on amyloidogenesis. *Science*. 2009 Mar 13;323(5920):1473-7
- Edbauer, D., Winkler, E., Regula, J. T., Pesold, B., Steiner, H., and Haass, C. (2003) Reconstitution of γ -secretase activity. *Nat. Cell Biol.* 5, 486–488.
- Egan M. F., Goldberg T. E., Kolachana B. S., Callicott J. H., Mazzanti C. M., Straub R. E., Weinberger D. G. (2001) Effect of *COMT* Val108/158 Met genotype on frontal lobe function and risk for schizophrenia. *Proceedings of the National Academy of Sciences in the U S A*, 98(12), 6917–6922.
- Egan M.F., Kojima M., Callicott J.H., Goldberg T.E., Kolachana B.S., Bertolino A. (2003) The *BDNF* val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of *BDNF* and human memory and hippocampal function. *Cell* 112:257–69.
- Ezquerro M, Carnero C, Blesa R, Oliva R. (2000) A novel presenilin 1 mutation (Leu166Arg) associated with early-onset Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 2000 Apr;57(4):485-8.
- Feher A., Juhasz A., Rimanoczy A., Kalman J., Janka Z. (2009) Association between *BDNF* Val66Met polymorphism and Alzheimer disease, dementia with Lewy bodies, and Pick disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 23, 224-228.
- Foltynie T., Lewis S.G., Goldberg T.E., Blackwell A.D., Kolachana B.S., Weinberger D.R., Robbins T.W., Barker R.A. (2005) The *BDNF* Val66Met polymorphism has a gender specific influence on planning ability in Parkinson's disease. *J Neurol* 252, 833-838.
- Francis P.T., Palmer A.M., Snape M., Wilcock G.K. (1999) The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *Journal of Neurology, Neurosurgery e Psychiatry*, 66(2), 137-147.
- Fukumoto N., Fujii T., Combarros O., Kamboh M.I., Tsai S.J., Matsushita S. (2010) Sexually dimorphic effect of the Val66Met polymorphism of *BDNF* on susceptibility to Alzheimer's disease: new data and meta-analysis. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 153B:235–42.
- Gandy S. (2005) The role of cerebral amyloid beta accumulation in common forms of Alzheimer disease. *J Clin Invest*. 2005 May;115(5):1121-9.
- Gennatas ED, Cholfin JA, Zhou J, (2012) *COMT* Val158Met genotype influences neurodegeneration within dopamine-innervated brain structures. *Neurology* 78: 1663–1669
- Giannelou A, Zhou Q, Kastner DL. (2014) When less is more: primary immunodeficiency with an autoinflammatory kick. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 14(6):491–500.
- Glenner G.G., Wong C.W. (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 120(3):885-90.
- Goate A., Chartier-Harlin M.C., Mullan M., Brown J., Crawford F., Fidani L., Giuffra L., Haynes A., Irving N., James L. (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349(6311):704–706.

- Golde TE, Streit WJ, Chakrabarty P (2013) Alzheimer's disease risk alleles in TREM2 illuminate innate immunity in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* 5: 24
- Gratacos M., Gonzalez J.R., Mercader J.M., de Cid R., Urretavizcaya M., (2007) Estivill X. Brain-derived neurotrophic factor Val66Met and psychiatric disorders: meta-analysis of case-control studies confirm association to substance-related disorders, eating disorders, and schizophrenia. *Biol Psychiatry* 61:911–22.
- Gu Y., Chen F., Sanjo N., Kawarai T., Hasegawa H., Duthie M., Li W., Ruan X., Luthra A., Mount H.T., Tandon A., Fraser P.E., George-Hyslop P. (2003) A β 1 interacts with mature and immature forms of presenilins and nicastrin and may play a role in maturation of presenilin–nicastrin complexes, *J. Biol. Chem.* 278:7374–7380.
- Guerreiro R.J., Lohmann E., Brás J.M., Gibbs J.R., Rohrer J.D., Gurunlian N., Dursun B., Bilgic B., Hanagasi H., Gurvit H., Emre M., Singleton A., Hardy J. (2013) Using exome sequencing to reveal mutations in TREM2 presenting as a frontotemporal dementia-like syndrome without bone involvement. *JAMA Neurol.* 70:78–84.
- Guo J, Wei J, Liao S, Wang L, Jiang H, Tang B. A novel presenilin 1 mutation (Ser169del) in a Chinese family with early-onset Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2010 Jan 1;468(1):34-7. Epub 2009 Oct 22
- Haass C, Selkoe DJ (2007) Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(2):101–112
- Haass C., Schlossmacher M.G., Hung A.Y., Vigo-Pelfrey C., Mellon A., Ostaszewski B.L., Lieberburg I., Koo E.H., Schenk D., Teplow D.B. (1992) Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature*, 359, 322–325.
- Hardy J, Allsop D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* 12:383– 8.
- Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297:353– 6.
- Hassanina O., Moustafab M., El Masryc T. (2014) Association of insertion–deletion polymorphism of ACE gene and Alzheimer's disease in Egyptian patients. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics.* Oct; 355-360.
- Ho BC, Wassink TH, O'leary DS, Sheffield VC, Andreasen NC. 2005. Catechol-O-methyl transferase Val158Met gene polymorphism in schizophrenia: working memory, frontal lobe MRI morphology and frontal cerebral blood flow. *Mol Psychiatry* 10(229): 287–298.
- Hock C., Heese K., Hulette C., Rosenberg C., Otten U. (2000) Region-specific neurotrophin imbalances in Alzheimer disease: decreased levels of brain-derived neurotrophic factor and increased levels of nerve growth factor in hippocampus and cortical areas. *Arch Neurol* 57:846–51.
- Holmes C. (2002) Genotype and phenotype in Alzheimer's disease. *Br J Psychiatry* 180:131-4.
- Hosak L. (2007) Role of the COMT gene Val158Met polymorphism in mental disorders: a review. *Eur Psychiatry* 22: 276–281.

- Hu C.J., Sung S.M., Liu H.C., Chang J.G. (1998) Association of apolipoprotein E genotype and intronic polymorphism of the presenilin-1 gene with Alzheimer's disease in elderly Taiwan Chinese. *J Neurol Sci.* 157, 158-61.
- Huang M., Wang D., Xu Z., Xu Y., Xu X., Ma Y., Xia Z. (2015) Lack of genetic association between TREM2 and Alzheimer's disease in East Asian population. *Am. J. Alzheimer's Dis. Other Dement.* 30, 541–546
- Huang R., Huang J., Cathcart H., Smith S., Poduslo S.E. (2007) Genetic variants in brain-derived neurotrophic factor associated with Alzheimer's disease. *J Med Genet* 44, e66.
- Jan A, Gokce O, Luthi-Carter R, Lashuel HA (2008) The ratio of monomeric to aggregated forms of Abeta40 and Abeta42 is an important determinant of amyloid-beta aggregation, fibrillogenesis, and toxicity. *J Biol Chem* 283(42):28176–28189
- Jan A, Adolfsson O, Allaman I, Buccarello AL, Magistretti PJ, Pfeifer A, Muhs A, Lashuel HA. (2011) Abeta42 neurotoxicity is mediated by ongoing nucleated polymerization process rather than by discrete Abeta42 species. *J Biol Chem* 286(10):8585–8596
- Jarrett J.T., Lansbury P.T. (1993) Seeding one-dimensional crystallization of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's Disease and scrapie?, *Cell* 73;1055–1058.
- Ji Y., Shi Z., Liu M., Liu S., Liu S., Wang J., (2014) Association between the COMTVal158Met Genotype and Alzheimer's disease in the Han Chinese population. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders Extra* 4, 14–21.
- Jimenez-D.R.M., Velez P.C. (2015) Alzheimer's Disease, *Drosophila melanogaster* and Polyphenols. *Adv Exp Med Biol.* 863:21-53
- Jin S.C., Benitez B.A., Karch C.M., Cooper B., Skorupa T., Carrell D., Norton J.B., Hsu S., Harari O., Cai Y. *et al.* (2014) Coding variants in TREM2 increase risk for Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 23: 5838 – 5846
- Jin S.C., Carrasquillo M.M., Benitez B.A., Skorupa T., Carrell D., Patel D., Lincoln S., Krishnan S., Kachadoorian M., Reitz C., Mayeux R., Wingo T.S., Lah J.J., Levey A.I., Murrell J., Hendrie H., Foroud T., Graff-Radford N.R., Goate A.M., Cruchaga C., Ertekin-Taner N. (2015) TREM2 is associated with increased risk for Alzheimer's disease in African Americans. *Mol Neurodegener.* Apr 10;10:19.
- Jonsson T., Atwal J.K., Steinberg S., Snaedal J., Jonsson P.V., Bjornsson S., Stefansson H., Sulem P., Gudbjartsson D., Maloney J., Hoyte K., Gustafson A., Liu Y., Lu Y., Bhangale T., Graham R.R., Huttenlocher J., Bjornsdottir G., Andreassen O.A., Jönsson E.G., Palotie A., Behrens T.W., Magnusson O.T., Kong A., Thorsteinsdottir U., Watts R.J., Stefansson K. (2012) A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature* 488(7409):96-9.
- Jonsson T, Atwal JK, Steinberg S, Snaedal J, Jonsson PV, Bjornsson S, Stefansson H, Sulem P, Gudbjartsson D, Maloney J, Hoyte K, Gustafson A, Liu Y, Lu Y, Bhangale T, Graham RR, Huttenlocher J, Bjornsdottir G, Andreassen OA, Jönsson EG, Palotie A, Behrens TW, Magnusson OT, Kong A, Thorsteinsdottir U, Watts RJ, Stefansson K. A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature.* 2012 Aug 2;488(7409):96-9.

Kang J., Lemaire H.G., Unterbeck A., Salbaum J.M., Masters C.L., Grzeschik K.H., Multhaup G., Beyreuther K., Müller-Hill B. (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 19-25;325(6106):733-6.

Kauhanen J., Hallikainen T., Tuomainen T.P., *et al.* (2000) Association between the functional polymorphism of catechol-O-methyltransferase gene and alcohol consumption among social drinkers. *Alcohol Clin Exp Res* 24: 135–139.

Kemppainen S., Rantamäki T., Jeronimo-Santos A., Lavasseur G., Autio H., Karpova N., Karkkainen E., Staven S., Vicente Miranda H., Outeiro T.F., Diogenes M.J., Laroche S., Davis S., Sebastiao A.M., Castren E., Tanila H. (2012). Impaired TrkB receptor signaling contributes to memory impairment in APP/PS1 mice. *Neurobiol Aging* 33, 1122. e23.

Kim K.W., Jhoo J.H., Lee K.U., Lee D.Y., Lee J.H., Youn J.Y., Lee B.J., Woo J.I. (2000) No association between presenilin 1 (PS1) intronic polymorphism and sporadic Alzheimer's disease in Koreans. *J. Neural. Transm.* 107; 1191-1200.

Kleinberger G, Yamanishi Y, Suarez-Calvet M, Czirr E, Lohmann E, Cuyvers E, Struyfs H, Pettkus N, Wenninger-Weinzierl A, Mazaheri F *et al* (2014) TREM2 mutations implicated in neurodegeneration impair cell surface transport and phagocytosis. *Sci Transl Med* 6: 243ra286

Knight WD, Kennedy J, Mead S, Rossor MN, Beck J, Collinge J, Mummery C. A novel presenilin 1 deletion (p.L166del) associated with early onset familial Alzheimer's disease. *European Journal of Neurology* 14: 829-831, 2007

Koponen E., Voikar V., Riekkari R., Saarelainen T., Rauramaa T., Rauvala H., Taira T., Castren E. (2004) Transgenic mice overexpressing the full-length neurotrophin receptor trkB exhibit increased activation of the trkB-PLCgamma pathway, reduced anxiety, and facilitated learning. *Mol Cell Neurosci* 26, 166-181.

Kuhn PH, Wang H, Dislich B, Colombo A, Zeitschel U, Ellwart JW, Kremmer E, Rossner S, Lichtenthaler SF (2010) ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO J* 29(17):3020– 3032.

Kung H. (2012) The β -Amyloid Hypothesis in Alzheimer's Disease: Seeing Is Believing. *ACS Med Chem Lett.* 2012 Apr 12; 3(4): 265–267.

Lammel A., Hetzel O., Hackel I., Jones B., Liss J. (2008) Unique properties of mesoprefrontal neurons within a dual mesocorticolimbic dopamine system. *Neuron*, 57, pp. 760–773.

Lanni C., Garbin G., Lisa A., Biundo F., Ranzenigo A., Sinforiani E., Cuzzoni G., Govoni S., Ranzani G.N., Racchi M. (2012) Influence of *COMT* Val158Met polymorphism on Alzheimer's disease and mild cognitive impairment in Italian patients. *Journal of Alzheimers Disease* 32, 919–926.

Lee J., Fukumoto H., Orne J., Klucken J., Raju S., Vanderburg C.R. (2005) Decreased levels of *BDNF* protein in Alzheimer temporal cortex are independent of *BDNF* polymorphisms. *Exp Neurol* 194:91–6

Lee Y.H., Song G.G., (2014) COMT Val158Met and PPARGgamma Pro12Ala polymorphisms and susceptibility to Alzheimer's disease: a meta-analysis. *Neurological Sciences* 35, 643–651.

Li H., Wetten S., Li St L., Jean P.L., Upmanyu R., Surh L., Hosford D., Barnes M.R., Briley J.D., Borrie M., Coletta N., Delisle R., Dhalla D., Ehm M.G., Feldman H. H., Fornazzari L., Gauthier S., Goodgame N., Guzman D., Hammond S., Hollingworth P., Hsiung G.Y., Johnson J., Kelly D.D., Keren R., Kertesz A., King K.S., Lovestone S., Loy-English I., Matthews P.M., Owen M.J., Plumpton M., Pryse-Phillips W., Prinjha R.K., Richardson J.C., Saunders A., Slater St A.J., George-Hyslop P.H., Stinnett S.W., Swartz J.E., Taylor R.L., Wherrett J., Williams J., Yarnall D.P., Gibson R.A., Irizarry M.C., Middleton L.T., Roses A. D. (2008) Candidate single-nucleotide polymorphisms from a genomewide association study of Alzheimer disease. *Archives of Neurology* 65, 45–53.

Li M., Chang H., Xiao X. (2016) BDNF Val66Met polymorphism and bipolar disorder in European populations: A risk association in case-control, family-based and GWAS studies. *Neurosci Biobehav Rev* 68, 218-233.

Li T., Yu S., Du J., Chen H., Jiang H., Xu K., Fu Y., Wang D., Zhao M. (2011) Role of novelty seeking personality traits as mediator of the association between COMT and onset age of drug use in Chinese heroin dependent patients. *PLoS One*. 6(8):e22923.

Li Y., Rowland C., Tacey K., Catanese J., Sninsky J., Hardy J. (2005) The *BDNF* Val66Met polymorphism is not associated with late onset Alzheimer's disease in three casecontrol samples. *Mol Psychiatry* 10:809–10.

Lin Y., Cheng S., Xie Z., Zhang D. (2014) Association of rs6265 and rs2030324 polymorphisms in brain-derived neurotrophic factor gene with Alzheimer's disease: a meta-analysis. *PLoS One* 9, e94961.

Lu L., Su Y., Hou P., Huang C. (2013) The *COMT* Val158Met polymorphism as an associated risk factor for Parkinson's disease in Asian rather than Caucasian populations. *Neurol India* 61(1):12–16

Martinez M.F., Martin X.E., Alcelay L.G., Flores J.C., Valiente J.M., Juanbeltz B.I., Beldarrain M.A., Lopez J.M., Gonzalez-Fernandez M.C., Salazar A.M., Gandarias R.B., Borda S.I., Marques N.O., Amillano M.B., Zabaleta M.C., de Pancorbo M.M. (2009) The *COMT* Val158 Met polymorphism as an associated risk factor for Alzheimer disease and mild cognitive impairment in APOE 4 carriers. *BMC Neuroscience* 10, 125.

Masters, C.L., Simms, G., Weinman, N.A., Multhaup, G., McDonald, B.L. & Beyreuther, K. (1985) Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 4245–4249.

Mielke M.M., Vemuri P., Rocca W.A. (2014) Clinical epidemiology of Alzheimer's disease: assessing sex and gender differences. *Clin Epidemiol* 6, 37-48

Milner, J.D. (2015) PLAID: a syndrome of complex patterns of disease and unique phenotypes. *J. Clin. Immunol.* 35, 527–530

Minichiello L. (2009) TrkB signalling pathways in LTP and learning. *Nat Rev Neurosci* 10, 850-860.

Miyashita A., Wen Y., Kitamura N., Matsubara E., Kawarabayashi T., Shoji M., Tomita N., Furukawa K., Arai H., Asada T., Harigaya Y., Ikeda M., Amari M., Hanyu H., Higuchi S., Nishizawa M., Suga M., Kawase Y., Akatsu H., Imagawa M., Hamaguchi T., Yamada M., Morihara T., Takeda M., Takao T., Nakata K., Sasaki K., Watanabe K., Nakashima K., Urakami K., Ooya T., Takahashi M., Yuzuriha T., Serikawa K., Yoshimoto S., Nakagawa R., Saito Y., Hatsuta H., Murayama S., Kakita A., Takahashi H., Yamaguchi H., Akazawa K., Kanazawa I., Ihara Y., Ikeuchi T., Kuwano R. (2014) Lack of genetic association between TREM2 and late-onset Alzheimer's disease in a Japanese population. *J. Alzheimers Dis.* 41, 1031–1038

Miyajima F., Ollier W., Mayes A., Jackson A., Thacker N., Rabbitt P., Payton A. (2008) Brain-derived neurotrophic factor polymorphism Val66Met influences cognitive abilities in the elderly. *Genes, Brain and Behavior* 7(4), 411–417.

Musiek ES, Holtzman DM (2015) Three dimensions of the amyloid hypothesis: time, space and 'wingmen'. *Nat Neurosci* 18: 800 – 806

Nakamura A., Inada T., Kitao Y., Katayama Y. (2001). Association between catechol-O-methyltransferase (COMT) polymorphism and severe alcoholic withdrawal symptoms in male Japanese alcoholics. *Addict Biol* 6: 233–238

Nielsen M.G., Congiu C., Bortolomasi M., Bonvicini C., Bignotti S., Abate M., Milanese E., Conca A., Cattane N., Tessari E., Gennarelli M, Minelli A. (2015) MTHFR: Genetic variants, expression analysis and COMT interaction in major depressive disorder. *Journal of Affective Disorders* 183;179–186

Nilsberth C., Westlind-Danielsson A., Eckman C.B., Condron M.M., Axelman K., Forsell C., Stenh C., Luthman J., Teplow D.B, Younkin S.G., Näslund J., Lannfelt L. (2001) The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced Ab protofibril formation. *Nat Neurosci* 4:887 –93.

Nobili, A. Latagliata E.C., Viscomi M.T., Cavallucci V., Cutuli D., Giacobazzo G., Krashia P., Rizzo F.R., Marino R., Federici M., De Bartolo P., Aversa D., Dell'Acqua M.C., Cordella A., Sancandi M., Keller F., Petrosini L., Puglisi-Allegra S., Mercuri N.B., Coccurello R., Berretta N., D'Amelio M. (2017) Dopamine neuronal loss contributes to memory and reward dysfunction in a model of Alzheimer's disease. *Nat. Commun.* 8, 14727.

Moreno-Castilla P., Rodriguez-Duran L. F. Guzman-Ramos K., Barcenas-Femat A., Escobar M. L., Bermudez-Rattoni F. (2016) Dopaminergic neurotransmission dysfunction induced by amyloid- β transforms cortical long-term potentiation into long-term depression and produces memory impairment. *Neurobiology of aging*, 41, 187-199.

Ono K, Condron MM, Teplow DB (2009) Structure-neurotoxicity relationships of amyloid beta-protein oligomers. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(35):14745–14750

Peng S., Wu J., Mufson E.J., Fahnstock M. (2005) Precursor form of brain-derived neurotrophic factor and mature brain-derived neurotrophic factor are decreased in the pre-clinical stages of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 93, 1412-1421.

- Pezawas L., Verchinski B.A., Mattay V.S., Callicott J.H., Kolachana B.S., Straub R.E. (2004) The brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism and variation in human cortical morphology. *J Neurosci* 24:10099–102.
- Pottier C., Wallon D., Rousseau S., Rovelet-Lecrux A., Richard A.C., Rollin-Sillaire A., Frebourg T., Campion D., Hannequin D. (2013) TREM2 R47H variant as a risk factor for early-onset Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 35:45–49
- Puglielli L., Tanzi R.E., Kovacs D.M. (2003) Alzheimer's disease: the cholesterol connection. *Nature Neuroscience* 6, 345 - 351
- Qi-Takahara Y., Morishima-Kawashima M., Tanimura Y., Dolios G., Hirotani N., Horikoshi Y., Kametani F., Maeda M., Saido T.C., Wang R., Ihara Y. (2005) Longer forms of amyloid beta protein: implications for the mechanism of intramembrane cleavage by gamma-secretase. *J Neurosci* 25(2):436–445
- Rassas A.A., Fredj S.H., Khiari H.M., Sahnoun S., Bibi A., Siala H., Mrabet A., Messaoud T. (2013) No association between an intronic polymorphism in the presenilin-1 gene and Alzheimer disease in a Tunisian population. *J. Neural Transm.* 120; 1355-1358.
- Rex C.S., Lin C.Y., Kramar E.A., Chen L.Y., Gall C.M., Lynch G. (2007) Brain-derived neurotrophic factor promotes long-term potentiation-related cytoskeletal changes in adult hippocampus. *J Neurosci* 27, 3017-3029.
- Robakis N.K., Ramakrishna N., Wolfe G., and Wisniewski H.M.. (1987) Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the cerebrovascular and the neuritic plaque amyloid peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 84(12): 4190–4194.
- Rogaeva E. (2002) The solved and unsolved mysteries of the genetics of early-onset Alzheimer's disease. *Neuromol Med* 2:1-10.
- Romas S.N., Mayeux R., Tang M.X., Lantigua R., Medrano M., Tycko B., Knowles J. (2000) No association between a presenilin 1 polymorphism and Alzheimer disease, *Arch. Neurol.* 57; 699-702.
- Rossato J. I., Bevilaqua L.R., Izquierdo I., Medina J.H., Cammarota M. (2009) Dopamine controls persistence of long-term memory storage. *Science* 325(5943);1017-1020.
- Russo-Neustadt A. (2003) Brain-derived neurotrophic factor, behavior, and new directions for the treatment of mental disorders. *Semin Clin Neuropsychiatry* 8: 109–18.
- Sato T, Dohmae N, Qi Y, Kakuda N, Misonou H, Mitsumori R, Maruyama H, Koo EH, Haass C, Takio K, Morishima-Kawashima M, Ishiura S, Ihara Y (2003) Potential link between amyloid beta-protein 42 and C-terminal fragment gamma 49–99 of beta-amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 278(27):24294–24301.
- Sambataro F., Reed J. D., Murty V. P., Das S., Tan H. Y., Callicott J. H., Mattay V. S. (2009) Catechol-O-methyltransferase valine(158)methionine polymorphism modulates brain networks underlying working memory across adulthood. *Biological Psychiatry* 66(6), 540–548.
- Scacchi R., Gambina G., Moretto G., Corbo R.M. (2009) Variability of AChE, BChE, and ChAT genes in the late-onset form of Alzheimer's disease and relationships with response to

treatment with Donepezil and Rivastigmine. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 150B, 502-507.

Scharfman H.E., MacLusky N.J. (2006) Estrogen and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in hippocampus: complexity of steroid hormone-growth factor interactions in the adult CNS. *Front Neuroendocrinol* 27, 415-435.

Schellekens AF, Franke B, Ellenbroek B, (2012) Reduced dopamine receptor sensitivity as an intermediate phenotype in alcohol dependence and the role of the *COMT* Val158Met and *DRD2* Taq1A genotypes. *Arch Gen Psychiatry* 69: 339–348.

Schlepckow K, Kleinberger G, Fukumori A, Feederle R, Lichtenthaler SF, Steiner H, Haass C (2017) An Alzheimer-associated *TREM2* variant occurs at the ADAM cleavage site and affects shedding and phagocytic function. *EMBO Mol Med* 9: 1356 – 1365

Schmechel D.E., Saunders A.M., Strittmatter W.J., Joo S.H., Hulette C., Crain B., Goldgaber D., Roses A.D. (1993) Increased vascular and plaque beta-A4 amyloid deposits in sporadic Alzheimer Disease patients with apolipoprotein e4, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 90;9649–9653.

Selkoe D.J. (1994) Normal and abnormal biology of B-Amyloid Precursor Protein, *Annu. Rev. Neurosci.* 17 489–517.

Serretti A., Olgiati P., De Ronchi D. (2007) Genetics of Alzheimer's disease. A rapidly evolving field. *J Alzheimers Dis* 12, 73-92.

Sherry S.T., Ward M.H., Kholodov M., Baker J., Phan L., Smigielski E.M., Sirotkin K. (2001). dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res.* 29, 308-11.

Sims R, van der Lee SJ, Naj AC, Bellenguez C, Badarinarayan N, Jakobsdottir J, Kunkle BW, Boland A, Raybould R, Bis JC et al (2017) Rare coding variants in *PLCG2*, *ABI3*, and *TREM2* implicate microglial-mediated innate immunity in Alzheimer's disease. *Nat Genet* 49: 1373 – 1384

Smrcka A.V. (2015) Regulation of Phosphatidylinositol-specific Phospholipase C at the Nuclear Envelope in Cardiac Myocytes. *J Cardiovasc Pharmacol.* 65(3): 203–210.

Solum D.T., Handa R.J. (2002) Estrogen regulates the development of brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein in the rat hippocampus. *J Neurosci* 22, 2650-2659.

Sonali N., Tripathi M., Sagar R., Vivekanandhan S. (2013) Val66Met polymorphism and BDNF levels in Alzheimer's disease patients in North Indian population. *Int J Neurosci* 123, 409-416

St George-Hyslop P.H., Petit A. (2004) Molecular biology and genetics of Alzheimer's disease. *C R Biol.* 2005 Feb;328(2):119-30.

Sweet RA, Devlin B, Pollock BG, (2005) Catechol-O-methyltransferase haplotypes are associated with psychosis in Alzheimer disease. *Mol Psychiatry* 10: 1026–1036

Takahashi RH, Capetillo-Zarate E, Lin MT, Milner TA, Gouras GK (2013) Accumulation of intraneuronal “-amyloid 42 peptides is associated with early changes in microtubule-associated protein 2 in neurites and synapses. *PLoS One* 8(1), e51965.

- Takami M., Nagashima Y., Sano Y., Ishihara S., Morishima-Kawashima M., Funamoto S., Ihara Y. (2009) Gamma-secretase: successive tripeptide and tetrapeptide release from the transmembrane domain of betacarboxyl terminal fragment. *J Neurosci* 29(41):13042–13052
- Tanzi R.E., Bertram L. (2001) New frontiers in Alzheimer's disease genetics. *Neuron* 32:181-4.
- Tanzi R.E., Gusella J.F., Watkins P.C., Bruns G.A., St George-Hyslop P., Van Keuren M.L., Patterson D., Pagan S., Kurnit D.M., Neve R.L. (1987) Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science*. 235(4791):880-4.
- Thies W., Bleiler L., Association As (2013) Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* 9(2):208–245.
- Thomsen T., Zendeh B., Fischer J.P., Kewitz H. (1991) In vitro effects of various cholinesterase inhibitors on acetyl- and butyrylcholinesterase of healthy volunteers. *Biochemical pharmacology*, 41(1), 139-141.
- Thornton P, Sevalle J, Deery MJ, Fraser G, Zhou Y, Stahl S, Franssen EH, Dodd RB, Qamar S, Gomez Perez-Nievas B et al (2017) TREM2 shedding by cleavage at the H157-S158 bond is accelerated for the Alzheimer's disease-associated H157Y variant. *EMBO Mol Med* 9: 1366 – 1378
- Tiedt HO1, Lueschow A, Winter P, Müller U. (2013) Previously not recognized deletion in presenilin-1 (p.Leu174del.) in a patient with early-onset familial Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. Jun 7;544:115-8.
- Tiihonen J, Hallikainen T, Lachman H, (1999) Association between the functional variant of the catechol-O-methyltransferase (*COMT*) gene and type 1 alcoholism. *Mol Psychiatry* 4: 286–289.
- Tolia A., De Strooper B. (2009) Structure and function of -secretase. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2;0, 211–218
- Tsai S.J., Hong C.J., Liu H.C., Liu T.Y., Liou Y.J. (2006) The brain-derived neurotrophic factor gene as a possible susceptibility candidate for Alzheimer's disease in a Chinese population. *Dement Geriatr Cogn Disord* 21, 139-143.
- Tunbridge EM, Farrell SM, Harrison PJ, Mackay CE. (2013) Catechol-O-methyltransferase (*COMT*) influences the connectivity of the prefrontal cortex at rest. *Neuroimage* 68: 49–54.
- Tysoe C., Whittaker J., Cairns N.J., Atkinson P.F., Harrington C.R., Xuereb J., Wilcock G., Rubinsztein D.C. (1997) Presenilin-1 intron 8 polymorphism is not associated with autopsy-confirmed late-onset Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 222, 68-9.
- Ulrich JD, Holtzman DM (2016) TREM2 function in Alzheimer's disease and neurodegeneration. *ACS Chem Neurosci* 7: 420 – 427
- Vassar R., Bennett B.D., Babu-Kahn S., Kahn S., Mendiaz E.A., Denis P., Teplow D.W., Ross S., Amarante P., Loeloff R., Luo Y., Fisher S., Fuller J., Louis J.C., Collins F., Treanor J., Rogers G., Citron M. (1999) Beta-secretase cleavage of Alzheimer's Amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE, *Science* 286;735–741.

- Vepsalainen S., Castren E., Helisalmi S., Iivonen S., Mannermaa A., Lehtovirta M. (2005) Genetic analysis of *BDNF* and *TrkB* gene polymorphisms in Alzheimer's disease. *J Neurol* 252:423–8.
- Vigo-Pelfrey C, Lee D, Keim P, Lieberburg I, Schenk DB (1993) Characterization of beta-amyloid peptide from human cerebrospinal fluid. *J Neurochem* 61(5):1965–1968
- Vieira R.N., Magalhaes J.D., Sant'Anna J., Moriguti M.M., de Paula J.J., Cintra M.T., de Miranda D.M., De Marco L., de Moraes E.N., Romano-Silva M.A., Bicalho M.A. (2015) The GAB2 and BDNF polymorphisms and the risk for late-onset Alzheimer's disease in an elderly Brazilian sample. *Int Psychogeriatr* 27, 1687-1692.
- Vina J., Lloret A. (2010) Why women have more Alzheimer's disease than men: gender and mitochondrial toxicity of amyloid-beta peptide. *J Alzheimers Dis* 20 Suppl 2, S527-533
- Walter J., Capell A., Grunberg J., Pesold B., Schindzielorz A., Prior R., Podlisny M.B., Fraser P., St George-Hyslop P., Selkoe D., Haass C. (1996) The Alzheimer's Disease associated presenilins are differentially phosphorylated proteins located predominantly within the endoplasmic reticulum, *Mol. Med.* 2;673–691.
- Witte A. V., Flöel A. (2012). Effects of *COMT* polymorphisms on brain function and behavior in health and disease. *Brain Research Bulletin* 88(5), 418–428.
- Yamada K., Mizuno M., Nabeshima T.(2002) Role for brain-derived neurotrophic factor in learning and memory. *Life Sci* 70:735–44.
- Yan W., Zhao C., Sun L., Tang B. (2016) Association between polymorphism of *COMT* gene (Val158Met) with Alzheimer's disease: an updated analysis. *J Neurol Sci* 361:250–255.
- Yan Y., Wang C. (2007) Aβ40 Protects Non-toxic Aβ42 Monomer from Aggregation, *J. Mol. Biol* 369;909–916
- Yasuda M.; Maeda K.; Hashimoto M.; Yamashita H.; Ikejiri Y.; Bird T.; Tanaka C.; Schellenberg G. (1999) A Pedigree With a Novel Presenilin 1 Mutation at a Residue That Is Not Conserved in Presenilin 2. *Arch Neurol.* 56(1):65-69.
- Yu G., Nishimura M., Arawaka S., Levitan D., Zhang L., Tandon A., Song Y., Rogaeva E., Chen F., Kawarai T., Supala A., Levesque L., Yu H., Yang D.S., Holmes E., Milman P., Liang Y., Zhang D.M., Xu D.H., Sato C., Rogaev E., Smith M., Janus C., Zhang Y., Aebersold R., Farrer L., Sorbi S., Bruni A.C., Fraser P.E., St George-Hyslop P.H. (2000) A novel protein (Nicastrin) modulates presenilin-mediated Notch/Glp1 And betaAPP processing, *Nature* 407;48–54.
- Yu J.T., Jiang T., Wang Y.L., Wang H.F., Zhang W., Hu N., Tan L., Sun L., Tan M.S., Zhu X.C., Tan L. (2014) Triggering receptor expressed on myeloid cells 2 variant is rare in late-onset Alzheimer's disease in Han Chinese individuals. *Neurobiol Aging.* 35: 937.e931–937.e933
- Yuan P, Condello C, Keene CD, Wang Y, Bird TD, Paul SM, Luo W, Colonna M, Baddeley D, Grutzendler J (2016) TREM2 haplodeficiency in mice and humans impairs the microglia barrier function leading to decreased amyloid compaction and severe axonal dystrophy. *Neuron* 90: 724 – 739

Zhang G., Li Y.C., Xu H.D., Liu X., Zhu J., Zhang F., Wang D., Wang Y., Jin C. (2015) Lack of association between COMT polymorphism rs4680 and risk of Alzheimer's disease in Asians: Evidence from a meta-analysis. *Psychiatry Res.* 30;228(3):979-81.

Zhou J., Li X.M., Jiang T., Liu Y., Chi S., Yu J.T., Tan L. (2013) Lack of association between COMT Val158Met polymorphism and late-onset Alzheimer's disease in Han Chinese. *Neurosci Lett.* 25;554:162-6.

Zuccato C., Cattaneo E. (2009) Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurol* 5, 311-322.

ANEXO A



Duque de Caxias, 16 de Abril de 2015.

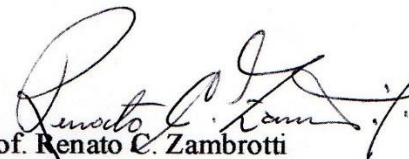
Do: Comitê de Ética em Pesquisa da UNIGRANRIO

Para Responsáveis Principais: Prof. Dr. Pedro Hermán Cabello Acero
Profa. Dra. Danielle Dutra Voigt
Profa. Dra. Verônica Marques Zembrzusi
Profa. Dra. Viviane Galante Ramos

O Comitê de Ética em Pesquisa da UNIGRANRIO, após avaliação considerou **aprovado** o projeto de pesquisa **“GENÉTICA DE DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS NO ENVELHECIMENTO”**, protocolado sob o **número de CAEE 43112214.0.0000.5283**, encontrando-se a referida pesquisa e o Termo de consentimento Livre e Esclarecido em conformidade com a Resolução N.º 466, de 12 de Dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde, sobre pesquisa envolvendo seres humanos.

Os pesquisadores deverão informar ao Comitê de Ética qualquer acontecimento ocorrido no decorrer da pesquisa.

O Comitê de Ética em Pesquisa solicita a V. S^a., que ao término da pesquisa, conforme cronograma apresentado, encaminhe a este comitê um sumário dos resultados do projeto, a fim de que seja expedido o certificado de aprovação final.


Prof. Renato C. Zambrotti
Coordenador do CEP-UNIGRANRIO


Andreia Peter Christo Gomes
Secretária do CEP/UNIGRANRIO

CEP/UNIGRANRIO – COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA da UNIGRANRIO
Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160 – 25 de Agosto – Duque de Caxias – CEP: 25071-202
Tel.: 21 2672-7733 – E-mail: rzambrotti@unigranrio.com.br

ANEXO B



Zembrzusi (vzembrzusi@gmail.com), Dra. Vivianne Galante Ramos (viviannegalante@yahoo.com.br), Dra. Claudia Maria Pereira (claudemarie_br@yahoo.com.br) e Danielle Dutra Voigt (Preceptora do LabGen - Laboratório de Genética da Unigranrio) - (dani_voigt@hotmail.com) ou no telefone do LabGen da UNIGRANRIO: (21) 2672-7881.

Pesquisador Responsável

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

O pesquisador me informou que o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UNIGRANRIO, localizada na Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160 – CEP 25071-202 TELEFONE (21).2672-7733 – ENDEREÇO ELETRÔNICO: cep@unigranrio.com.br

Rio de Janeiro, ____ de ____ de 20____.

Sujeito da pesquisa

ou Responsável Legal

ANEXO C



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(De acordo com as normas da Resolução nº 466, do Conselho Nacional de Saúde de 12/12/2012)

Você está sendo convidado para participar da pesquisa – *Análise de Fatores Genéticos Envolvidos no Desenvolvimento de Doenças Neurodegenerativas durante o Processo de Envelhecimento*. Você foi selecionado por ser maior de 55 anos e sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador da Unigranrio ou com o Posto Médico Sanitário de Campos Eliseos.

Os objetivos deste estudo são: 1) Este projeto se propõe estudar fatores genéticos que possam estar influenciando o desenvolvimento de doenças próprias da população idosa como são aquelas relacionadas à perda de memória, tremor, depressão e demência.

2) Pretende-se ainda, estudar fatores que modulem o risco de desenvolver tais doenças.

3) Compreender a forma de atuação de todos esses fatores de maneira a identificar a doença de maneira precoce que permita adotar os tratamentos e cuidados médicos mais adequados para atenuar ou diminuir esses riscos.

Sua participação nesta pesquisa consistirá em doar uma amostra de 5 ml de sangue total que será utilizada para posterior extração de DNA, podendo ser solicitada uma segunda coleta, caso o material não seja suficiente ou sofra algum tipo de alteração (coagulação, hemólise). Isto não acarreta nenhum prejuízo ou risco para a saúde do paciente, exceto aqueles relacionados com um pequeno desconforto, comum à retirada rotineira de sangue ou um pequeno hematoma; este procedimento será realizado por pessoal previamente treinado. Os benefícios relacionados com a sua participação são de grande importância científica pois seus resultados permitirão adotar medidas apropriadas para melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação. O sigilo e a confidencialidade das informações obtidas pelo estudo serão preservados. A identidade dos participantes não será revelada, pois cada amostra de material biológico fará parte de um banco de dados identificados por códigos numéricos específicos.

Uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com o senhor (a), podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento com os pesquisadores responsáveis: Dr. Pedro Heman Cabello (Responsável) no e-mail pedro.acero@unigranrio.com.br, Dra. Verônica Marques

ANEXO D

Questionário de Avaliação Clínica da Demência

Esta é uma entrevista semiestruturada. Coloque todas as perguntas que se seguem. Coloque quaisquer outras perguntas necessárias para determinar a Avaliação Clínica da Demência (CDR) do doente. Anote as informações das perguntas adicionais.

Perguntas sobre a memória para o informante (pessoa próxima do doente):

1. O doente tem problemas de memória ou raciocínio? ☐ Sim ☐ Não
- 1a. Se respondeu sim, o problema é constante (no sentido oposto de inconstante)? ☐ Sim ☐ Não
2. O doente consegue lembrar-se de acontecimentos recentes? ☐ Geralmente ☐ Às vezes ☐ Raramente
3. O doente consegue memorizar uma pequena lista de coisas (compras)? ☐ Geralmente ☐ Às vezes ☐ Raramente
4. Verificou-se algum declínio na memória ao longo do último ano? ☐ Sim ☐ Não
5. A memória do doente apresenta limitações ao ponto de estas poderem ter interferido com as suas atividades do dia-a-dia há alguns anos (ou durante a sua vida ativa)? (opinião de pessoas próximas do doente) ☐ Sim ☐ Não
6. O doente esquece-se completamente de um acontecimento importante (por exemplo: viagem, festa, casamento de família) algumas semanas depois do acontecimento? ☐ Geralmente ☐ Às vezes ☐ Raramente
7. O doente esquece-se de pormenores marcantes desse acontecimento importante? ☐ Geralmente ☐ Às vezes ☐ Raramente
8. O doente esquece-se completamente de informações importantes do passado distante (por exemplo: data de nascimento, data de casamento, local de emprego)? ☐ Geralmente ☐ Às vezes ☐ Raramente
9. Fale-me de um acontecimento recente na vida do doente do qual ele se deveria lembrar. (Obtenha pormenores tais como o local do acontecimento, hora, convidados, duração, quando acabou e como o doente ou outros convidados chegaram lá, para posterior comparação com as respostas do doente).

No espaço de 1 semana:

No espaço de 1 mês:

10. Quando é que o doente nasceu?

11. Onde é que o doente nasceu?

12. Qual foi a última escola que o doente frequentou?

- Nome

- Cidade

- Classe

13. Qual foi a ocupação/emprego principal do doente (ou emprego do parceiro, caso o doente não tivesse emprego)?

14. Qual foi o último emprego principal do doente (ou emprego do parceiro, caso o doente não tivesse emprego)?

15. Quando se reformou o doente (ou o parceiro) e porquê?

Questionário de Avaliação Clínica da Demência

Perguntas sobre a orientação para o informante:

Com que frequência sabe o doente exatamente:

1. O dia do mês?

☐ Geralmente ☐ Às vezes ☐ Raramente ☐ Não sei

2. O mês?

☐ Geralmente ☐ Às vezes ☐ Raramente ☐ Não sei

3. O ano?

☐ Geralmente ☐ Às vezes ☐ Raramente ☐ Não sei

4. O dia da semana?

☐ Geralmente ☐ Às vezes ☐ Raramente ☐ Não sei

5. O doente tem dificuldades de orientação em relação ao tempo (situar os acontecimentos no tempo)?

☐ Geralmente ☐ Às vezes ☐ Raramente ☐ Não sei

6. O doente consegue orientar-se em ruas que lhe são familiares?

☐ Geralmente ☐ Às vezes ☐ Raramente ☐ Não sei

7. Com que frequência sabe ele/ela como deslocar-se de um local para o outro, fora da sua área de residência?

☐ Geralmente ☐ Às vezes ☐ Raramente ☐ Não sei

8. Com que frequência consegue o doente orientar-se dentro de casa?

☐ Geralmente ☐ Às vezes ☐ Raramente ☐ Não sei

Questionário de Avaliação Clínica da Demência

Perguntas sobre o discernimento e resolução de problemas para o informante:

1. De um modo geral, se tivesse de avaliar a capacidade do doente para resolver problemas presentemente, consideraria essa capacidade:
 - ☐ Tão boa como no passado
 - ☐ Boa, mas não tanto como no passado
 - ☐ Razoável
 - ☐ Má
 - ☐ Inexistente

2. Avalie a capacidade do doente para lidar com pequenas quantias de dinheiro (por exemplo: calcular trocos, deixar uma pequena gorjeta):
 - ☐ Nenhuma perda de capacidade
 - ☐ Alguma perda de capacidade
 - ☐ Grave perda de capacidade

3. Avalie a capacidade do doente para lidar com assuntos financeiros ou comerciais complicados (por exemplo: verificar o livro de cheques, pagar contas):
 - ☐ Nenhuma perda de capacidade
 - ☐ Alguma perda de capacidade
 - ☐ Grave perda de capacidade

4. O doente consegue lidar com uma pequena emergência doméstica (por exemplo: fuga de água nas canalizações, pequeno incêndio)?
 - ☐ Tão bem como antes
 - ☐ Pior do que antes, devido às dificuldades de raciocínio
 - ☐ Pior do que antes, outra razão (porquê) _____

5. O doente consegue compreender situações ou explicações?
 - ☐ Geralmente ☐ Às vezes ☐ Raramente ☐ Não sei

6. O doente comporta-se* de forma adequada [isto é, no seu estado habitual (pré-mórbido)] em situações sociais e interações com outras pessoas?
 - ☐ Geralmente ☐ Às vezes ☐ Raramente ☐ Não sei

*Esta pergunta avalia o comportamento, não a aparência.

Questionário de Avaliação Clínica da Demência

Perguntas sobre o relacionamento com a comunidade para o informante:

Trabalho

1. O doente ainda trabalha? Sim Não N/A
 Se não for aplicável, prossiga para a pergunta 4 ☐ ☐ ☐
 Se respondeu Sim, prossiga para a pergunta 3
 Se respondeu Não, prossiga para a pergunta 2
2. Problemas de memória ou raciocínio contribuíram para a decisão do doente em se reformar? (A pergunta 4 é a seguinte) ☐ Sim ☐ Não ☐ N/S
3. Doente tem dificuldades significativas no emprego, devido aos problemas de memória ou raciocínio?
☐ Raramente ou nunca ☐ Às vezes ☐ Geralmente ☐ Não sei

Vida social

4. O doente já alguma vez conduziu? ☐ Sim ☐ Não
 O doente conduz atualmente? ☐ Sim ☐ Não
 Se respondeu Não, é devido aos problemas de memória ou raciocínio? ☐ Sim ☐ Não
5. Se o doente ainda conduz, verificam-se problemas ou riscos devido a um raciocínio insuficiente? ☐ Sim ☐ Não

*6. O doente consegue fazer compras sozinho?

- ☐ Raramente ou nunca ☐ Às vezes ☐ Geralmente ☐ Não sei
(Tem de ser acompanhado em qualquer ida às compras) (Compra apenas um número limitado de coisas; compra coisas a dobrar ou esquece-se de coisas necessárias)

7. O doente consegue realizar atividades fora de casa sozinho?

- ☐ Raramente ou nunca ☐ Às vezes ☐ Geralmente ☐ Não sei
(De um modo geral não é capaz de realizar atividades sem ajuda) (Participação limitada e/ou rotineira, por exemplo: participação superficial em atividades religiosas ou reuniões; idas ao cabeleireiro) (Participação ativa em atividades, por exemplo: votações)

8. O doente é levado para atividades sociais fora de casa? ☐ Sim ☐ Não
 Se respondeu Não, porque não? _____

9. Avaliando o comportamento do doente, um observador casual diria que o doente está doente? ☐ Sim ☐ Não

10. Caso se encontre num lar de terceira idade, o doente participa ativamente em atividades sociais (raciocínio)? ☐ Sim ☐ Não

IMPORTANTE:

Existem informações suficientes para avaliar o nível de limitação do doente nas atividades em comunidade?

Se respondeu Não, tente obter mais informações.

Relacionamento com a comunidade: Tais como atividades religiosas, visitas a amigos ou familiares, atividades políticas, organizações profissionais, como a Ordem dos Advogados, outros grupos profissionais, clubes, organizações de serviços, programas educativos.

***Se for necessário, acrescente notas para esclarecer o nível de funcionamento do doente nesta área.**

Questionário de Avaliação Clínica da Demência

Perguntas sobre as atividades domésticas e passatempos para o informante:

1a. Que alterações ocorreram na capacidade do doente em realizar tarefas domésticas? _____

1b. Quais são as tarefas que o doente ainda faz bem? _____

2a. Quais são as alterações verificadas na capacidade do doente em realizar passatempos? _____

2b. Quais são os passatempos que o doente ainda realiza bem? _____

3. Caso se encontre num lar de terceira idade, quais são as atividades que o doente já não faz bem (tarefas domésticas e passatempos)? _____

Atividades do dia-a-dia (The Dementia Scale of Blessed):

	Nenhuma perda de capacidade		Grave perda de capacidade
4. Capacidade de desempenhar tarefas domésticas	0	0,5	1
Descreva: _____			

5. O doente tem capacidade para realizar tarefas ao nível de:
(Selecione uma resposta. Não é necessário perguntar diretamente ao informante).

- ☐ Nenhum funcionamento significativo.
(Realiza atividades simples, como fazer a cama, apenas com muita supervisão)
- ☐ Funciona apenas em atividades limitadas.
(Com alguma supervisão, lava a loiça com uma eficiência aceitável; põe a mesa)
- ☐ Funciona de forma independente em algumas atividades.
(Utiliza aparelhos, como um aspirador; prepara refeições simples)
- ☐ Funciona em atividades habituais, mas não ao nível habitual.
- ☐ Funciona normalmente em atividades habituais.

IMPORTANTE:

Existem informações suficientes para avaliar o nível de limitação do doente nas atividades domésticas e passatempos?

Se respondeu Não, tente obter mais informações.

Tarefas Domésticas: Como cozinhar, tratar da roupa, limpar, fazer compras, levar o lixo à rua, trabalhar no quintal, realizar tarefas simples de manutenção e reparações domésticas básicas.

Passatempos: Costura, pintura, trabalhos manuais, leitura, entretenimento, fotografia, jardinagem, assistir a peças de teatro ou concertos, carpintaria, prática de desporto.

Questionário de Avaliação Clínica da Demência

Perguntas sobre os cuidados pessoais para o informante:

*Qual é a sua estimativa da capacidade mental do doente nas seguintes áreas:

	Sem ajuda	Botões ocasionalmente mal abotoados, etc.	Sequência errada, peças frequentemente esquecidas	Incapaz de se vestir
A. Vestir-se (The Dementia Scale of Blessed)	0	1	2	3
	Sem ajuda	Necessita de instruções	Às vezes necessita de ajuda	Necessita sempre ou quase sempre de ajuda
B. Lavar-se, arranjar-se	0	1	2	3
	De forma limpa; talheres adequados	De forma desordenada; colher	Sólidos simples	Tem de ser alimentado
C. Hábitos alimentares	0	1	2	3
	Controlo completo normal	Às vezes urina na cama	Urina frequentemente na cama	Incontinência dupla (urina e fezes)
D. Controlo dos esfíncteres (The Dementia Scale of Blessed)	0	1	2	3

* Pode ser considerada a classificação de 1, se os cuidados pessoais do doente estiverem limitados face a um nível anterior, mesmo não recebendo instruções.

Questionário de Avaliação Clínica da Demência

Perguntas sobre a memória para o doente:

1. Tem problemas de memória ou raciocínio? ☐ Sim ☐ Não
2. Há poucos instantes, o seu (parceiro, etc.) contou-me um acontecimento que se passou recentemente. Quer contar-me o que aconteceu? (Se for necessário, obtenha pormenores tais como o local, hora, pessoas envolvidas, qual foi a duração, quando acabou e como o doente ou outras pessoas chegaram lá).

No espaço de 1 semana

1,0 – Correto (em grande parte) _____

0,5 _____

0,0 – Incorreto (em grande parte) _____

No espaço de 1 mês

1,0 – Correto (em grande parte) _____

0,5 _____

0,0 – Incorreto (em grande parte) _____

3. Vou dar-lhe um nome e um endereço para memorizar durante alguns minutos. Repita este nome e endereço: (Repita até a frase ser repetida corretamente ou até um máximo de três tentativas).

Elementos	1	2	3	4	5
	João	Borges,	Rua do Mercado,	42	Guimarães
	João	Borges,	Rua do Mercado,	42	Guimarães
	João	Borges,	Rua do Mercado,	42	Guimarães

(Sublinhe os elementos repetidos de forma correta em cada uma das tentativas).

4. Quando nasceu? _____
5. Onde nasceu? _____
6. Qual foi a última escola que frequentou?
- Nome _____
- Cidade _____ Classe _____
7. Qual foi a sua ocupação/emprego principal (ou do seu parceiro, caso não tivesse emprego)? _____
8. Qual foi o seu último emprego principal (ou do seu parceiro, caso não tivesse emprego)? _____
9. Quando se reformou (ou o seu parceiro) e porquê? _____

10. Repita o nome e endereço que lhe pedi para memorizar:

Elementos	1	2	3	4	5
	João	Borges,	Rua do Mercado,	42	Guimarães

(Sublinhe os elementos repetidos corretamente).

Questionário de Avaliação Clínica da Demência

Perguntas sobre a orientação para o doente:

Registe literalmente a resposta do doente a cada pergunta

1. Qual é a data de hoje?

☐ Correto ☐ Incorreto

2. Qual é o dia da semana?

☐ Correto ☐ Incorreto

3. Qual é o mês?

☐ Correto ☐ Incorreto

4. Qual é o ano?

☐ Correto ☐ Incorreto

5. Qual é o nome deste local?

☐ Correto ☐ Incorreto

6. Em que terra nos encontramos?

☐ Correto ☐ Incorreto

7. Que horas são?

☐ Correto ☐ Incorreto

8. (Na sua opinião), o doente sabe quem é o informante?

☐ Correto ☐ Incorreto

Questionário de Avaliação Clínica da Demência

Perguntas sobre o discernimento e resolução de problemas para o doente:

Instruções: Caso a resposta inicial do doente não mereça uma avaliação de 0, insista no assunto para identificar o melhor entendimento do problema por parte do doente. Marque com um círculo a resposta que mais se aproxima.

Semelhanças:

Exemplo: “Em que aspeto se assemelha um lápis a uma caneta? (instrumentos de escrita)”

Em que aspeto se assemelham estas coisas?”

Resposta do doente

1. nabo.....couve-flor _____

(0 = vegetais)

(1 = alimentos comestíveis, seres vivos, podem ser cozinhados, etc.)

(2 = respostas não pertinentes; diferenças; compram-se)

2. escrivaninha.....estante de livros _____

(0 = mobiliário, mobiliário de escritório; ambos servem para guardar livros)

(1 = em madeira, pernas)

(2 = não pertinentes; diferenças)

Diferenças:

Exemplo: “Qual é a diferença entre açúcar e vinagre? (doce vs. ácido)”

Qual é a diferença entre estas coisas?”

3. mentira.....erro _____

(0 = um é intencional, o outro não)

(1 = um é mau, o outro é bom – ou explica apenas um)

(2 = tudo o resto, semelhanças)

4. rio.....canal _____

(0 = natural - artificial)

(2 = tudo o resto)

Cálculos:

5. Quantos cêntimos perfazem um euro?

☐

Correto

☐

Incorreto

6. Quantas moedas de 50 cêntimos perfazem 13,50 euros?

☐

Correto

☐

Incorreto

7. Subtraia 3 a 20 e continue a subtrair 3 a cada número novo até ao fim.

☐

Correto

☐

Incorreto

Discernimento:

8. Depois de chegar a uma cidade que não conhece, de que forma tentaria localizar um amigo que gostaria de visitar?

(0 = tentar a lista telefónica; telefonar a um amigo comum)

(1 = telefonar à polícia, telefonar para as Informações (normalmente não facultam endereços)

(2 = nenhuma resposta clara)

9. Avaliação do doente relativamente à sua incapacidade e posição na vida e a sua perceção das razões porque está presente neste exame (mesmo que já tenha avaliado este aspeto, classifique aqui):

☐

Bom discernimento

☐

Discernimento parcial

☐

Pouco discernimento

AVALIAÇÃO CLÍNICA DA DEMÊNCIA (CDR)

AVALIAÇÃO CLÍNICA DA DEMÊNCIA (CDR):	0	0,5	1	2	3
--------------------------------------	---	-----	---	---	---

	Limitação				
	Nenhuma 0	Suspeita 0,5	Ligeira 1	Moderada 2	Grave 3
Memória	Nenhuma perda de memória ou esquecimento ligeiro inconstante	Esquecimento ligeiro constante; recordação parcial dos acontecimentos; esquecimento "benigno"	Perda de memória moderada; mais acentuada nos acontecimentos recentes; interfere com as atividades do dia-a-dia	Perda de memória grave; apenas memorização de material retido com insistência; rápida perda de material novo	Perda de memória grave; restam apenas fragmentos
Orientação	Bem orientado	Bem orientado com ligeira dificuldade nas relações temporais	Dificuldade moderada nas relações temporais; orientado no espaço durante o exame; possível desorientação geográfica noutros locais	Dificuldade grave nas relações temporais; quase sempre desorientado no tempo, frequentemente no espaço	Orientado apenas em relação a si próprio
Discernimento e resolução de problemas	Resolve problemas do dia-a-dia, lida bem com atividades financeiras e de negócio; bom discernimento em relação a desempenhos no passado	Ligeira limitação para resolver problemas, semelhanças e diferenças	Dificuldades moderadas para resolver problemas, semelhanças e diferenças; normalmente mantém o discernimento social	Limitação grave para resolver problemas, semelhanças e diferenças; normalmente o discernimento social é limitado	Incapacidade de discernimento ou resolução de problemas
Relacionamento com a comunidade	Funcionamento independente ao nível habitual no trabalho, compras, grupos de voluntariado e outros	Ligeira limitação nestas atividades	Incapaz de funcionar independentemente nestas atividades, embora, de certa forma, ainda possa estar envolvido; numa avaliação superficial aparenta normalidade	Incapacidade de funcionamento independente fora de casa Aparenta estar suficientemente bem para realizar atividades fora de casa	
Casa e passatempos	Vida em casa, passatempos e interesses intelectuais bem preservados	Vida em casa, passatempos e interesses intelectuais ligeiramente limitados	Limitação ligeira, mas evidente, do funcionamento em casa; abandono das tarefas mais difíceis; abandono dos passatempos e interesses mais complicados	Preservado apenas o interesse nas tarefas simples; interesses muito restritos e fracos	Nenhuma capacidade significativa de realizar funções em casa
Cuidados pessoais	Inteiramente capaz de cuidar de si próprio		Necessita de instruções	Necessita de ajuda para se vestir, para a higiene e para manter objetos pessoais	Necessita de muita ajuda com os cuidados pessoais; incontinência frequente

Classifique apenas como declínio face ao nível habitual anterior devido a perda cognitiva, não devido a limitação resultante de outros fatores.