UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE – UFCSPA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Cíntia Monique Boschmann Ens de Bem

Associação dos genes *DNMT3B* e *APOE* em Pacientes com Doença de Alzheimer em Comparação a Indivíduos com Envelhecimento Saudável.

Porto Alegre
2015

Cíntia Monique Boschmann Ens de Bem

Associação dos genes *DNMT3B* e *APOE* em Pacientes com Doença de Alzheimer em Comparação a Indivíduos com Envelhecimento Saudável.

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Analuiza Camozzato de Pádua
Coorientadora: Profa. Dra. Marilu Fiegenbaum

Porto Alegre
2015

Catalogação na Publicação

Bem, Cíntia Monique Boschmann Ens de
Associação dos genes DNMT3B e APOE em pacientes com Doença de Alzheimer em comparação a indivíduos com envelhecimento saudável. / Cíntia Monique Boschmann Ens de Bem. -- 2015.
73 f. : tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2015.

Orientador(a): Profa. Dra. Analuiza Camozzato de Pádua ; coorientador(a): Profa. Dra. Marilu Fiegenbaum.

1. Doença de Alzheimer. 2. Epigenética. 3. Apolipoproteína E. 4. DNA-metiltransferases. I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

CERTIFICADO

Certificamos, para os devidos fins, que **Cintia Monique Boschmann Ens de Bem**, no dia 17/07/2015, apresentou a Dissertação de Mestrado intitulada *"Associação dos genes DNMT3B e APOE em Pacientes com Doença de Alzheimer em Comparação a Indivíduos com Envelhecimento Saudável"*, orientada pela professora Analuiza Camozzato de Pádua e coorientada pela professora Marilu Fiegenbaum, junto ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. A aluna foi considerada aprovada obtendo o título de *Mestre em Ciências da Saúde: Biologia Celular e Molecular.*

Porto Alegre, 17 de julho de 2015.

Marisiela Paelo
Secretária Executiva
Pós-Graduação-UFCSPA

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não teria sido concebido sem o apoio e auxílio de algumas pessoas muito importantes, por isso, agradeço:

a Deus, por um dia de cada vez renovar minha esperança e minha força para realizar este trabalho;

ao meu marido, Bernardo, por amar-me, suportar-me, compreender-me de forma única todos os dias; agradeço por sua incansável paciência e apoio;

a minha família, pelos valores que me ensinaram, pelo sustento e apoio dados para que pudesse alcançar este objetivo e também pelas palavras de incentivo;

às amigas que se fizeram “mais chegadas que um irmão”, que torceram e apoiaram-me com palavras, com gestos e com muitas orações;

às minhas orientadoras, Analuiza e Marilu, pela paciência e compreensão que tiveram e, principalmente, pelo auxílio na etapa final sem o qual este trabalho não teria sido concluído. Obrigada por todos os ensinamentos que foram passados com tanta dedicação;

aos colegas do laboratório de Biologia Molecular pelas oportunidades que tive de aprender com cada experiência compartilhada e pelos amigos que fiz ali;

à UFCSPA pela oportunidade de realizar este trabalho de pós-graduação; e

às instituições de fomento, CNPq e CAPES, pelo suporte financeiro dado a este trabalho de pesquisa.

RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença complexa e multifatorial com vários genes e polimorfismos que possuem uma contribuição individual muito pequena para o desenvolvimento da DA. No entanto, o alelo *APOEε4* tem sido fortemente associado como fator de risco para a doença e sua relevância já está bem estabelecida. As enzimas DNA-metiltransferases são o principal catalisador para a metilação - mecanismo epigenético que altera a expressão gênica. Recentemente, encontramos uma associação do haplótipo TGG do gene *DNMT3B* que confere um risco aumentado de 3 vezes para o desenvolvimento de DA. Portanto, hipotetizamos que o alelo *APOEε4* e o haplótipo TGG contribuam de forma independente para DA, aumentando assim o risco. A amostra foi composta de 212 indivíduos caucasianos (108 controles saudáveis e 104 com DA de acordo com os critérios da NINCDS-ADRDA e do DSM-IV-TR) do sul do Brasil. A análise genética foi realizada por PCR em tempo real para ensaio TaqMan®. A regressão logística multivariada foi realizada de acordo com categorização dos grupos estabelecidos conforme presença ou ausência de *APOEε4* e/ou do haplótipo TGG. A presença do haplótipo TGG mais o alelo *APOEε4* foi fortemente associada ao risco de desenvolver DA [OD 11,13; IC (4,25-29,16); p <0,001]. Esta associação resultou em um risco maior do que cada fator isolado. Até onde temos conhecimento, este é o primeiro estudo que buscou analisar a interação do gene *DNMT3B* com *o APOEε4* em pacientes com DA, com resultados muito interessantes no contexto dos estudos de interações genéticas. A presença do haplótipo TGG e do *APOEε4* são insuficientes para causar DA, embora eles aumentem significativamente o risco de desenvolver a doença.

Palavras-chave: *APOEε4*; *DNMT3B*; Epigenética; Doença de Alzheimer

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a complex and multifactorial disease with several genes and polymorphisms that have a small individual contribution to its development. Among these genes, the *APOEε*4 allele has been strongly associated to AD and its relevance as risk factor is already well established. The DNA-methyltransferase enzymes are the main catalyst for methylation - epigenetic mechanism that alters gene expression. Recently, we found an association of the TGG haplotype in the *DNMT3B* gene with AD. We hypothesized that *APOEε4*, and TGG haplotype could independently contribute to AD, thereby increasing the risk. The sample was composed of 212 Caucasian subjects (108 healthy controls and 104 with AD by NINCDS-ADRDA and DSM-IV-TR criteria) from southern Brazil. The genetic analyses were performed by real time PCR for TaqMan® assay. Multivariate logistic regression was performed categorizing groups according to the presence or absence of *APOEε4* and/or TGG haplotype as independent variable for outcome AD. The presence of TGG haplotype plus the allele *APOEε4* were strongly associated with the risk of developing AD [OD 11.13; CI(4.25 to 29.16); p<0.001]. This association had a higher risk than each factor isolated. As far as we know, this is the first study that tried to analyze the interaction of *DNMT3B* gene with the *APOEε4* in patients with AD, with interesting findings in the context of the gene interactions studies. The presence of TGG haplotype and *APOEε4* significantly increased the risk of developing the disease.

Keywords: *APOEε4*; *DNMT3B*; Epigenetics; Alzheimer’s disease.

SUMÁRIO

1. **INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA DO ESTUDO** 9
2. **REVISÃO DE LITERATURA** 11
1. CONCEITO DE DEMÊNCIA OU TRANSTORNO NEUROCOGNITIVO MAIOR DEVIDO À DOENÇA DE ALZHEIMER (DA) 11
2. FATORES DE RISCO 17
3. GENÉTICA DA DOENÇA DE ALZHEIMER 17
4. APOE COMO FATOR DE RISCO PARA DOENÇA DE ALZHEIMER 20
5. MECANISMOS EPIGENÉTICOS 23
6. EPIGENÉTICA, MEMÓRIA, ENVELHECIMENTO E A DOENÇA DE ALZHEIMER. 26
7. DNA-METILTRANSFERASES E VARIABILIDADE GENÉTICA 33
3. **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** 36
4. **OBJETIVOS** 42
Objetivo Geral: *42*
Objetivos Específicos: *42*
5. **ARTIGO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO** 43
THE ADDICTIVE RISK EFFECT OF APOLIPOPROTEIN E4 AND DNMT3B HAPLOTYPE FOR ALZHEIMER'S DISEASE 43
ABSTRACT 44
INTRODUCTION 45
METHODS AND MATERIALS 46
RESULTS AND DISCUSSION 47
ACKNOWLEDGEMENTS 49
CONFLICT OF INTEREST 49
REFERENCES 49
ANEXOS 55
PARECER CONSTANSUBSTANCIADO CEP 55
NORMAS DA REVISTA – MOLECULAR BIOLOGY REPORTS 58

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

O objetivo dos estudos de associação genética é identificar padrões de polimorfismos que variam sistematicamente entre os indivíduos com diferentes fenótipos que poderiam, portanto, representar os efeitos de alelos de aumento de risco ou de proteção. Essa associação existe porque a função do gene foi alterada de algum modo pela variante que está sendo avaliada - ou por outra variante em desequilíbrio de ligação com a variante estudada - e esta alteração de função influencia o fenótipo. Essa abordagem pode ajudar a identificar processos biológicos específicos subjacentes às características que podem ser difíceis de estudar em humanos.

A maior parte dos casos de demência devido à doença de Alzheimer são esporádicos e são considerados doenças complexas do ponto de vista genético, i.e., os genes de risco são geralmente vários, apresentando padrões intrincados de interação entre si e não exibem um único modo de herdabilidade. Dentro deste contexto de doença genética “complexa”, variantes comuns de DNA (tais como polimorfismos de nucleotídeo único) podem aumentar significativamente o risco, mas são insuficientes para causar a doença.

O principal fator de risco genético para o desenvolvimento das placas amiloides na DA de início tardio tem sido relacionada a polimorfismos de nucleotídeo único da apolipoproteína E (*APOE*), principalmente relacionados ao alelo *APOEε4* (BALLARD et al., 2011). Infere-se que o risco para DA em pessoas que possuem apenas um alelo ε4 de *APOE* pode ser de duas a três vezes maior, já àqueles que possuem dois alelos ε4 o risco pode ser até 12 vezes maior (BALLARD et al., 2011; MICHAELSON, 2014).

A complexidade genética da doença de Alzheimer tem incitado pesquisas sobre epigenética nesta doença. A epigenética se refere a alterações na expressão gênica que ocorrem sem alteração na sequência do DNA funcionando como um nível “extra” no controle transcricional que regula a

maneira como o gene é expresso (RODENHISER; MANN, 2006). Mecanismos epigenéticos podem ser o meio pelo qual os fatores ambientais podem influenciar a expressão de genes e podem fornecer um ponto de intersecção para os diversos fatores de risco e processos fisiopatológicos da doença de Alzheimer, por exemplo (MASTROENI et al., 2011). As enzimas DNA metiltransferases (DNMTs) são catalisadoras de metilação do DNA, um dos principais mecanismos epigenéticos. Em estudo publicado recentemente (PEZZI et al., 2014), nosso grupo de pesquisa demonstrou que portadores do haplótipo TGG da *DNMT3B* tiveram um risco três vezes maior de desenvolver a DA do que indivíduos não portadores deste haplótipo (PEZZI et al., 2014). Este foi o primeiro estudo descrevendo esta associação e os achados deverão ser replicados em futuras investigações. Entretanto é um achado original, muito interessante e, embasou o objetivo e justificativa da presente investigação. Assim, considerando que o alelo ε4 da *APOE* é um fator de risco bem conhecido para DA e a associação significativa entre variantes do gene da *DNMT3B* encontrada recentemente pelo nosso grupo de pesquisa (PEZZI et al., 2014), nós hipotetizamos que ambos os genes possam contribuir de forma independente e portanto aumentar o risco para DA.

A seguir serão descritos a revisão de literatura, os objetivos, o artigo submetido para a publicação com os resultados encontrados e as conclusões finais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

1. CONCEITO DE DEMÊNCIA OU TRANSTORNO NEUROCOGNITIVO MAIOR DEVIDO À DOENÇA DE ALZHEIMER (DA)

A doença de Alzheimer foi descrita pela primeira vez em 1907 pelo neuropatologista alemão Alois Alzheimer. O caso relatado era de uma mulher de 51 anos de idade que apresentava uma rápida perda de memória associada a outros distúrbios psiquiátricos e que veio a falecer quatro anos mais tarde (CASTELLANI et al., 2010).

A doença de Alzheimer é a causa mais comum das demências, entretanto, deve-se fazer o diagnóstico diferencial com outras etiologias de demência, tais como, demência vascular, demência por Corpos de Lewy, demência na doença de Parkinson, demência frontotemporal e outras demências reversíveis (CASTELLANI et al., 2010).

Em todo o mundo estima-se que existam em torno de 24 milhões de pessoas com demência (BALLARD et al., 2011). Destes, de 50 a 70% receberam um diagnóstico clínico da doença de Alzheimer (BLAZER; STEFFENS, 2009). De acordo com o Estudo Delphi, estima-se que em 2001 havia cerca de 24,3 milhões de pessoas com demência em todo mundo e para os anos de 2020 e 2040 estes números devem chegar a 42,3 milhões e 81,1 milhões respectivamente (BALLARD et al., 2011).

Os países ou regiões com o maior número de afetados pela demência são China e os países em desenvolvimento no Pacífico Ocidental, seguidos pelo ocidente europeu e, logo após, os EUA. O Estudo Delphi estima a prevalência de demência na América Latina, em pessoas acima de 60 anos no ano de 2005, em 4,6% e o número de pessoas, nessa mesma faixa etária, que convivem com a demência, em milhões, no ano 2000 era de 1,8 milhões. De acordo com esse mesmo estudo, para o ano de 2020 e 2040 são estimados 4,1 e 9,1 milhões respectivamente. Entretanto, esses índices de prevalência são

discutíveis, pois não se sabe se esses resultados variam de acordo com uma relação com idade ou se são provenientes de variações metodológicas adotadas nos estudos (BALLARD et al., 2011). Além disso, a prevalência da doença aumenta exponencialmente com a idade, passando de 3% entre os 65 – 74 anos para valores em torno de 50% aos 85 anos ou mais (CASTELLANI et al., 2010).

Com relação aos valores de incidência da DA, sabe-se que existe um aumento com a idade e estes índices dobram a cada cinco a dez anos. Para as pessoas entre as idades 65-69, 70-74, 75-79, 80-84 e 85 e mais velhos, a incidência da doença de Alzheimer tem sido estimada em 0,6%, 1,0%, 2,0%, 3,3% e 8,4% (CASTELLANI et al., 2010).

A doença de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa primária caracterizada por deterioração adquirida da memória e de outras funções cognitivas que leva a morte em 3 a 9 anos após o diagnóstico. Essa doença compromete difusamente o córtex cerebral o que resulta em atrofia cerebral progressiva – que afeta primariamente o hipocampo (KATSUNO; TANAKA; SOBUE, 2012). As regiões subcorticais também são acometidas, sendo o núcleo basal de Meynert - estrutura colinérgica localizada na substância inominata e que emite projeções para o córtex cerebral – outra região bastante afetada, podendo ocorrer uma perda neuronal de 30 a 50% (NETO; ELKIS, 2007). Mesmo nos estágios iniciais da doença, exames de imagem do cérebro mostram redução do volume do hipocampo bilateralmente, e esta redução parece progredir com a doença. Em relação ao quadro clínico, a demência é geralmente insidiosa, de evolução lenta e progressiva (NETO; ELKIS, 2007).

A definição de demência inclui um prejuízo de múltiplas funções cognitivas, adquirido e progressivo, de intensidade suficiente para provocar incapacitação funcional ao indivíduo acometido. Os critérios diagnósticos do DSM-V para demência ou transtorno neurocognitivo maior são (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013):

A. Evidência de declínio significativo de um nível prévio de desempenho em pelo menos dois domínios cognitivos (atenção complexa,

função executiva, memória e aprendizagem, linguagem, percepção motora, ou cognição social) baseado em:

1. Queixa do paciente, de um informante confiável, ou do médico, de que está ocorrendo um declínio na função cognitiva, e;

2. Prejuízo moderado no desempenho cognitivo, preferencialmente documentado por testagem neuropsicológica, ou, na sua ausência, por outro instrumento de avaliação clínica.

B. Os prejuízos cognitivos interferem na independência para as atividades de vida diária.

C. Os prejuízos cognitivos não ocorrem exclusivamente em um contexto de *delirium.*

D. Os prejuízos cognitivos não são melhor explicados pela presença de outro transtorno psiquiátrico (ex. esquizofrenia, depressão maior).

Os critérios diagnósticos da DSM-V para demência ou transtorno neurocognitivo maior devido à doença de Alzheimer são os seguintes:

A. Preencher critérios para transtorno neurocognitivo maior ou demência.

B. Início insidioso e declínio progressivo de pelo menos dois domínios cognitivos.

C. Se um dos itens 1 ou 2 abaixo estiverem presentes o indivíduo preenche os critérios para demência devido à doença de Alzheimer provável, caso contrário preencherá critérios para demência devido à doença de Alzheimer possível:

1. Evidência de DA causada por mutação genética através de história familiar ou testagem genética.

2. Todos os 3 itens seguintes:

a) Evidência de prejuízo cognitivo de memória e aprendizado e pelo menos um outro domínio cognitivo.

b) Declínio cognitivo gradual, progressivo e contínuo.

c) Nenhuma evidência de etiologia mista (i.e. ausência de outra doença neurodegenerativa ou cerebrovascular, ou outra doença neurológica, mental ou sistêmica que possa contribuir para o prejuízo cognitivo).

As marcas patológicas essenciais da DA são as perdas neuronal e sináptica as quais caracterizam as alterações atróficas presentes no cérebro de um paciente com DA. Essas perdas são acompanhadas pelo acúmulo das placas senis e dos emaranhados neurofibrilares. Perda neuronal certamente resulta em perda sináptica, entretanto, há indícios de que a perda sináptica precede a perda das células neurais. Esta perda neuronal e sináptica é quase sempre acompanhada por um aumento do número de astrócitos. Além disso, anomalias vasculares são comuns no cérebro da doença de Alzheimer (BLAZER; STEFFENS, 2009).

Quanto aos aspectos histopatológicos mais estudados e que estão envolvidos na patogênese da DA destacam-se as duas características mais marcantes dessa doença: as placas senis e os depósitos intracelulares de filamentos neurofibrilares (BALLARD et al., 2011). A placa senil possui uma estrutura globular discreta; é constituída por um núcleo amiloide denso, rodeado por um inchaço axonal e processos dendríticos, os quais contêm proteínas anormalmente montadas associadas à microtúbulos, depósitos amiloides extracelulares, astrócitos reativos e células da microglia. Em função dos depósitos extracelulares de proteína amiloide as placas também são denominadas de placas amiloides (BLAZER; STEFFENS, 2009).

A hipótese amiloide sugere que os depósitos de proteína β-amiloide (Aβ) desencadeiem a disfunção e morte neuronais no cérebro (BALLARD et al., 2011). As placas amiloides compostas, principalmente, por peptídeos Aβ são gerados a partir de clivagem proteolítica do precursor da proteína amiloide - APP. Alguns estudos demonstram que a proteína Aβ é capaz de produzir

efeitos tóxicos nos neurônios e induzir deficiências cognitivas em animais (KATSUNO; TANAKA; SOBUE, 2012).

Estudos de composição molecular indicam a presença de várias proteínas da cascata inflamatória nas placas senis. Isso levou alguns pesquisadores a acreditarem que o sistema imune desempenha um papel muito importante na formação dessas estruturas (BLAZER; STEFFENS, 2009). Além disso, sabe-se que o depósito de proteína β-amiloide causa reação inflamatória, formação de radicais livres, estresse oxidativo e ruptura mitocondrial (NETO; ELKIS, 2007).

A segunda característica mais marcante da DA são os emaranhados ou filamentos neurofibrilares. Ao contrário das placas senis, que são uma marca única da doença de Alzheimer, os emaranhados neurofibrilares são encontrados em uma série de distúrbios neurodegenerativos. Os principais são a Degeneração Lobar Frontotemporal, a Paralisia Supranuclear Progressiva, Degeneração Corticobasal, Parkinsonismo Pós-encefalítico, Demência Pugilística, Esclerose Lateral Amiotrófica ou Complexo Parkinsonismo-Demência de Guam, Panencefalite Esclerosante Subaguda e Doença de Niemann-Pick, além de serem relacionados à Síndrome de Down e ao envelhecimento normal (CASTELLANI et al., 2010).

Os emaranhados neurofibrilares são a maior lesão microscópica na DA e estão localizados, principalmente, nos neurônios piramidais do “Corno de Amon” ou, hipocampo propriamente dito, e no neocórtex. Entretanto, podem ser encontrados também em estruturas cerebrais mais profundas como, por exemplo, no mesencéfalo e no tegmento pontino, no núcleo basal de Meynert e no hipotálamo (CASTELLANI et al., 2010).

Essas estruturas são inclusões neuronais compostas por proteínas de baixo peso molecular associadas a microtúbulos, conhecidas como “tau”. A sua configuração é determinada pela forma dos neurônios onde se depositam, podendo ocorrer na forma piramidal, quando localizados no hipocampo, ou ainda assumirem a forma globosa quando ocorrem em estruturas subcorticais (BLAZER; STEFFENS, 2009).

A proteína tau é o maior componente dos emaranhados neurofibrilares. A hipótese da cascata amiloide propõe que a partir de alterações na proteína tau ocorra a formação dos emaranhados em consequência da concentração tóxica da proteína Aβ. A proteína tau é solúvel, porém são produzidos agregados insolúveis durante a formação dos emaranhados neurofibrilares, o que rompe a estrutura e função dos neurônios (BALLARD et al., 2011).

Ainda que a proteína tau seja mais presente nos emaranhados neurofibrilares, outros componentes têm sido identificados nessas estruturas. Os principais são: elementos do citoesqueleto, elementos relacionados à protease, proteoglicanos, moléculas inflamatórias, moléculas amiloidogênicas – como a presenilina e apolipoproteína - e produtos de stress oxidativo (CASTELLANI et al., 2010).

Outras alterações histopatológicas que são vistas na doença de Alzheimer incluem a degeneração granulovacuolar e os corpos de Hirano. A degeneração granulovacuolar é comumente encontrada em neurônios piramidais do hipocampo, mostra-se como inclusões citoplasmáticas distintas compostas de um grânulo central, basofílico rodeado por um halo claro. Estas inclusões são derivadas de lisossomas e o grânulo central é composto por vários citoesqueletos, em particular, epitopos de tau. Já os corpos de Hirano são inclusões eosinofílicas em forma de bastonete também compostas de proteínas do citoesqueleto, neste caso, actina e proteínas associadas à actina (CASTELLANI et al., 2010).

Quanto à patogênese da doença de Alzheimer existem várias hipóteses correntes. Além das teorias abordadas, há estudos que mencionam a falha sináptica, a depleção de neurotrofinas e de neurotransmissores, a disfunção mitocondrial, a via de sinalização da insulina, o stress oxidativo, os efeitos cardiovasculares, o metabolismo do colesterol, a inflamação, os déficits do transporte axonal ao surgimento ou desenvolvimento da doença de Alzheimer (QUERFURT; LAFERLA, 2010). Entretanto, supõe-se que a etiologia da doença envolva uma interação entre diversos fatores de risco ambientais e genéticos.

2. FATORES DE RISCO

A prevalência da demência de Alzheimer está intimamente associada à idade, que é um fator de risco primário (BLAZER; STEFFENS, 2009). Exceto os indivíduos geneticamente predispostos à doença de Alzheimer, não se observa casos dessa doença na meia idade (CASTELLANI et al., 2010). Já no caso da doença complexa, diversos são os fatores que influenciam o desenvolvimento dessa enfermidade, dentre os quais, pode-se citar traumatismo craniano e lesão cerebral, doença vascular cerebral, hiperlipidemia, hipertensão, aterosclerose, doença cardíaca coronária, fibrilação atrial, tabagismo, obesidade e diabetes (BLAZER; STEFFENS, 2009). A reserva cognitiva - conceito que combina educação, ocupação e atividades mentais - atuaria como um fator protetor para a doença (CASTELLANI et al., 2010).

Além dos fatores de risco associados à DA já relatados, existem também os fatores genéticos, os quais vêm sendo cada vez mais investigados e são descritos a seguir.

3. GENÉTICA DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Geneticamente a DA é uma doença complexa e heterogênea e segue uma dicotomia relacionada à idade: há uma forma rara de doença monogênica com início precoce associada a mutações em diferentes genes (*APP, PSEN1* e *PSEN2*); são altamente penetrantes e transmitidas de forma autossômica dominante. Há outra forma onde não há agregação familiar óbvia, sendo de início tardio (acima dos 65 anos). Esta última forma representa a maior parte dos casos de DA (mais de 90%) (BERTRAM; TANZI, 2005).

Com exceção dos raros casos autossômicos dominantes descritos acima, a doença de Alzheimer é considerada uma doença genética complexa, os genes de risco são geralmente vários, apresentando padrões intrincados de

interação entre si e não exibem um único modo de herdabilidade. Uma hipótese é que estas doenças de genética complexa são governadas por variantes comuns de DNA (tais como polimorfismos de nucleotídeo único) e que estas variantes aumentam significativamente o risco, mas são insuficientes para causar a doença.

No momento, nenhuma mutação única causal foi identificada nos casos de início tardio. A maior parte dos casos são complexos e comumente influenciados por uma mistura de fatores de risco genéticos, tais como, variantes nos genes que codificam a apolipoproteína E (*APOE*) e o receptor relacionado à sortilina 1 (*SORL1*) e por fatores de risco adquiridos como hipertensão, diabetes e, provavelmente, por muitos outros fatores a serem definidos (PATTERSON et al., 2008).

O principal fator de risco genético para o desenvolvimento das placas amiloides na DA de início tardio tem sido relacionada à apolipoproteína E (*APOE*) que apresenta três formas alélicas: *APOEε*2, *APOE*ε3 e *APOEε4*. Sendo o alelo *APOEε4* o que confere maior risco para a DA (BALLARD et al., 2011).

APOE é uma molécula transportada com o colesterol que está envolvida na depuração de Aβ. As isoformas de *APOE* possuem uma diferença na eficiência de transporte dos lipídios. O alelo *APOEε4* está associado à carga amiloide e à disfunção colinérgica aumentada. Estima-se que este al elo apresente um efeito de risco de 3-10 vezes maior para o desenvolvimento da doença (BALLARD, et al., 2011).

No entanto, muitos portadores do alelo de risco *APOEε4* vivem em seus 90 anos e não apresentam demência, o que sugere a existência de outros fatores de risco genéticos e / ou ambientais que ainda não foram identificados (BEKRIS et al., 2010). O risco para DA aumenta e a idade média de início é antecipada à medida que o número de alelos ε4 que um indivíduo carrega aumentam de 0 a 2. Estes resultados foram confirmados em uma meta-análise, que analisou mais de 14.000 indivíduos, representando vários grupos étnicos. Embora o efeito da *APOEε4* em aumentar o risco de Alzheimer tenha sido

evidente em ambos os sexos, em todas as idades e grupos étnicos, a magnitude do risco associado com *APOEε4* variou por idade e etnia. Especificamente, o risco parece ser atenuado em indivíduos idosos e em indivíduos africanos e latino-americanos, comparando-os aos brancos. Em contraste, o risco conferido pela *APOEε4* foi aumentado em indivíduos de etnia japonesa (BLAZER; STEFFENS, 2009).

O gene da *SORL1* interage com *APOE*, afetando o tráfico de APP e a superexpressão dessa proteína resulta na produção reduzida de Aβ. A ligação de *SORL1* à APP resulta na produção diminuída de Aβ. SORL1 é um substrato de alfa-secretase. As concentrações de *SORL1* são reduzidas em pacientes com doença de Alzheimer (BALLARD et al., 2011).

Estima-se que em torno de 70% do risco para o desenvolvimento da DA possam ser atribuídos à genética (BALLARD et al., 2011). Pesquisadores têm descrito as questões que têm dificultado a identificação específica de genes de risco para a doença de Alzheimer, sendo uma das mais relevantes o fato de que o aumento do risco global conferido por um único gene no caso das doenças complexas é muito pequeno (HARDY, MYERS, WAVRANT-DE VRIEZE, 2004). Além dos genes associados às doenças complexas, faz-se necessário identificar combinações de alelos de risco, em função da interação intergênica. Outro fator complicador é a heterogeneidade das mudanças patológicas subjacentes, particularmente concomitantes a doença cerebrovascular (BALLARD et al., 2011).

Além dos genes clássicos relacionados à DA, outros têm sido investigados. As mutações no gene *TAU* resultam em tauopatias, tais como, a degeneração córtico-basal e a demência frontotemporal, mas não a doença de Alzheimer. No entanto, tau é um importante substrato patológico da DA, sendo um alvo em potencial para desenvolvimento de tratamento porque emaranhados de tau são mais estreitamente relacionados com a gravidade da demência do que são as placas de Aβ (BALLARD et al., 2011).

Além disso, recentes estudos de associação ampla de genoma de pacientes com doença de Alzheimer identificaram mutações em genes tais

como *CLU* e *PICALM*, mas os riscos associados eram pequenos (0,87) e grandes grupos de replicação são necessários (> 10 000 pessoas). Estes genes não auxiliam na predição de risco da DA, mas poderão ter um papel importante na identificação das vias envolvidas na doença e são potenciais alvos terapêuticos (BALLARD et al., 2011).

4. APOE COMO FATOR DE RISCO PARA DOENÇA DE ALZHEIMER

Apesar dos inúmeros genes candidatos identificados e relacionados com a patogênese da doença de Alzheimer, esses ainda não superam o impacto causado pelo alelo ε4 do gene da Apolipoproteína E (*APOE*). Estima-se que em uma população controle típica, aproximadamente 20% dos indivíduos sejam carreadores de pelo menos um alelo ε4, já em pacientes com DA esporádica e não aparentados, esse percentual poderá alcançar os 65% e chegar aos 80% em pacientes aparentados com a doença+ (ZHONG, WEISGRABER, 2009).

Com base em estudos epidemiológicos e genéticos, infere-se que o risco para DA em pessoas que possuem apenas um alelo ε4 de *APOE* pode ser de duas a três vezes maior, já àqueles que possuem dois alelos o risco pode ser até 12 vezes maior. Estima-se que na população caucasiana cerca de 60% dos pacientes com DA sejam portadores do alelo ε4. Sabe-se também que cada cópia do alelo ε4 reduz a idade de início da doença de 7 a 9 anos, comparando-se os pacientes com DA não carreadores de ε4. Curiosamente, o alelo *APOEε2* é protetor, sendo que apenas cerca de 10% dos pacientes com DA possuem o alelo ε2, enquanto na população normal a ocorrência é duas vezes maior (MICHAELSON, 2014). O alelo ε3 é o mais frequente na população, com uma frequência que varia entre os 50 – 90%, enquanto a frequência do alelo ε2 e do ε4 estão entre 5 - 35% e 1 – 5 %, respectivamente (VERGHESE, CASTELLANO, HOLTZMAN, 2011).

A apolipoproteína E (*APOE*) é uma lipoproteína com 299 aminoácidos e é expressa em diversos tecidos, porém a maior expressão ocorre no fígado e nos macrófagos, seguida pelo encéfalo (VERGHESE, CASTELLANO, HOLTZMAN, 2011). Ela possui três isoformas e as diferenças entre elas estão limitadas aos aminoácidos 112 e 158, onde estão presentes ou a cisteína ou a arginina. Dessa forma, temos que o alelo ε2 possui duas cisteínas (Cys112, Cys158), o alelo ε3 possui uma cisteína e uma arginina (Cys112, Arg158) e, finalmente, o alelo ε4 possui duas argininas (Arg112, Arg158). Essa diferença entre os aminoácidos dessas duas posições afeta a estrutura das isoformas de *APOE*, influenciando sua capacidade de ligação aos lipídios, aos receptores e a proteína Aβ, afetando, assim, a depuração e a agregação de Aβ (LIU et al., 2013). Essa diferença causa uma interação anormal no domínio de *APOE* e uma instabilidade estrutural que têm sido relacionadas à neurodegeneração (ZHONG, WEISGRABER, 2009).

A *APOE* é responsável pelo transporte, entrega e distribuição de lipídios de um tecido ou célula a outro, através de receptores de *APOE*, proteínas associadas ao transporte de lipídios e lipólise, dessa forma, regulando o metabolismo dos lipídios (VERGHESE, CASTELLANO, HOLTZMAN, 2011). No SNC, os astrócitos são responsáveis pela maior produção de *APOE*, seguida pela microglia e, atua transportando colesterol para os neurônios através de receptores de *APOE* que são membros da família de receptores de lipoproteína de baixa densidade (LIU et al., 2013).

Duas das principais marcas da DA são as placas senis e a angiopatia causada pelo acúmulo da proteína Aβ. *APOE* tem uma importante função no metabolismo de Aβ e estudos têm mostrado que os genótipos de *APOE* afetam o depósito de Aβ para a formação das placas senis e também causa a angiopatia amiloide. Através de estudos de imunohistoquímica, observou-se que *APOE* é depositada juntamente com a proteína Aβ nas placas senis e também que os carreadores de ε4 possuem uma maior quantidade de Aβ depositada na forma de placas senis nos pacientes com DA (LIU et al., 2013).

De acordo com Liu e cols, 2013, as isoformas de *APOE* podem funcionar de formas diferentes. Assim sendo, o alelo ε4, na patogênese da DA, pode causar, por exemplo, o acúmulo de funções tóxicas ou a perda da atividade neuroprotetora da *APOE*. Os principais mecanismos nos quais a *APOE* está envolvida e suas isoformas têm demonstrado impactos diferentes nesses processos são: a atividade e atrofia cerebrais, plasticidade sináptica, neuroinflamação e neurogênese (LIU et al., 2013). Além desses os processos que apresentam grande impacto na patogênese da DA são:

- Metabolismo, agregação e depósito de Aβ: em estudos com ratos o alelo ε4 mostrou–se menos eficiente do que o alelo ε3 na depuração da proteína Aβ. Isso porque a lipoproteína *APOEε4* liga-se à proteína Aβ com uma menor afinidade quando comparado à lipoproteína *APOEε3*, além disso, estudos em microglia sugerem que esta lipoproteína realiza uma degradação de Aβ mediada por enzimas mais eficientes do que aquela (LIU et al., 2013).

- Fosforilação da tau e neurotoxicidade: a expressão neuronal de *APOE* pode ser induzida em resposta a estresse ou danos provavelmente para reparo e remodelamento neuronais. Assim, a hiperfosforilação da tau aumenta em razão de um fragmento de *APOEε4* truncado resultante de uma clivagem proteolítica da *APOE* em resposta a esses danos. *APOEε4* aumenta a disfunção mitocondrial, o rompimento do citoesqueleto, além de agravar os efeitos desencadeados por Aβ (LIU et al., 2013).

- Metabolismo de lipídios: para que ocorra o aprendizado, a formação de memórias e o reparo neuronal são essenciais que aconteçam o crescimento, o remodelamento e a formação de novas sinapses. Para que essas etapas aconteçam adequadamente é necessário que o colesterol seja entregue aos neurônios, função de responsabilidade da *APOE*. Assim sendo, nota-se a relevância do metabolismo dos lipídios para a patogênese da DA (LIU et al., 2013).

5. MECANISMOS EPIGENÉTICOS

Epigenética se refere ao estudo de alterações na expressão gênica que ocorrem sem alteração na sequência do DNA. Mecanismos epigenéticos são como um nível “extra” no controle transcricional que regula a maneira como o gene é expresso. Este campo, que está crescendo rapidamente, oferece excitantes novas oportunidades para o diagnóstico e o tratamento de doenças complexas (RODENHISER; MANN, 2006).

A epigenética busca explicar a interação de fatores ambientais como a alimentação, a exposição a elementos perigosos e outros eventos da vida os quais podem influenciar a expressão gênica. Os mecanismos epigenéticos poderiam, por exemplo, fornecer um ponto de intersecção para os diversos fatores de risco e os processos fisiopatológicos da doença de Alzheimer (MASTROENI et al., 2011). A expressão gênica pode sofrer alterações decorrentes de mudanças nos padrões epigenéticos o que resulta em modificações dos fatores de risco à doenças, resposta ao estresse e metabolismo (LILLYCROP et al., 2005; LIU et al.,1997; MCGOWAN et al., 2009)

Os principais mecanismos epigenéticos conhecidos são a metilação, a modificação de histonas, o remodelamento da cromatina e os pequenos RNAs não-codificantes, da expressão em inglês “small non coding RNAs”. Enquanto a metilação do DNA é a modificação do DNA mais conhecida, a modificação de histonas ocorre pós-transcricionalmente e determina onde a cromatina estará ativa ou inativa e isso, por sua vez, afeta a expressão dos genes presentes naquela região. Já os pequenos RNAs não-codificantes afetam a transcrição de vários genes (BISHOP; FERGUSON, 2015).

A epigenética compreende mecanismos de modificações reversíveis do genoma de herança mitótica ou meiótica que não são consequentes de mudanças na sequência do DNA (TAMMEN; FRISO; CHOI, 2013). Fatores

epigenéticos são quimicamente estáveis e afetam a transcrição do gene, alterando o fenótipo sem alterações correspondentes no genótipo. Eles podem explicar algumas diferenças entre gêmeos monozigóticos como, por exemplo, na sua susceptibilidade às doenças, embora esta hipótese deva considerar os efeitos ambientais como moduladores ou indutores desses fatores (SANTOS; MAZZOLA; CARVALHO, 2005).

A metilação do DNA envolve a adição de um grupo metil às citosinas dentro dos pares CpG (citosina/guanina) (EHRLICH; WANG, 1981; LAIRD; JAENISCH, 1994). DNA-metiltransferases (DNMTs) são enzimas que transferem grupos metil aos resíduos de citosina na posição 5’ do anel pirimídico. Somente as citosinas seguidas por guanina podem ser metiladas. Em torno de 70% dos dinucleotídeos existentes são metilados, estando entre as regiões mais altamente metiladas do genoma (MASTROENI et al., 2011). O restante dos dinucleotídeos CpG não metilados ocorrem em pequenos agrupamentos, chamados de “ilhas de CpG” (LEVENSON; SWEATT, 2005). Estes agrupamentos de ilhas de CpG são alvos para proteínas que se ligam aos pares CpGs não metilados e iniciem a transcrição gênica (ROBERTSON, 2002).

O padrão de metilação dos genomas dos oócitos e dos espermatozóides é apagado após a fertilização. Em seguida, um padrão específico da linhagem *de novo* de metilação é concluído e cada gene deve receber um padrão específico de metilação do DNA ao longo do período de reprogramação (TAMMEN; FRISO; CHOI, 2013). Esse padrão de metilação pode ser herdado pelas células filhas após a mitose ou divisão meiótica (SANTOS; MAZZOLA; CARVALHO, 2005). Em células somáticas animais, 1% das bases de DNA apresentam-se metiladas, afetando 60-90% dos dinucleotídeos CpG no genoma. Embora muito reduzida, esta metilação *de novo* pode causar modificação dos marcadores epigenéticos (SANTOS; MAZZOLA; CARVALHO, 2005).

Recentemente, tem sido demonstrado que a percentagem (em vez do número absoluto) de CpGs metiladas é relativamente baixo em ilhas CpG

convencionais e é realmente maior em promotores com densidades intermediárias de CpG. A metilação de sequências CpG pode alterar a expressão do gene através da indução de modificações de histonas que inibem o acesso da maquinaria transcricional. Espera-se, então, que os genes altamente metilados sejam reprimidos e que a hipometilação de um gene conduzirá à expressão aumentada ou superexpressão em comparação com o estado reprimido normalmente metilado. Entretanto, alguns estudos apontam para exceções a essa regra e, por isso, seria importante o acompanhamento do genoma através de perfis de metilação do DNA, os quais devem indicar um número limitado de CpGs por gene, incluindo margens e regiões flanqueadoras. Além disso, esses perfis de metilação exigem validação dos efeitos funcionais na expressão dos genes e nos níveis de proteínas (MASTROENI et al., 2011).

Há uma possibilidade de que a metilação *de novo* em células de mamíferos que ocorre no início do desenvolvimento não discrimine os genes-alvo, mas afete todas CpGs disponíveis. Este padrão global de metilação é compatível com o fato de que não existe uma sequência no genoma de mamífero que seja intrinsecamente não-metilada. Mesmo algumas ilhas CpG, que na maioria das vezes estão não-metiladas, podem ser metiladas, em determinadas circunstâncias, durante o desenvolvimento normal ou tumoral. Também é evidente que nem todas as regiões do genoma são igualmente acessíveis para as DNA-metiltransferases. Particularmente, *DNMT3B* é requerida para a metilação *de novo* de regiões genômicas específicas, tais como, o DNA repetitivo de regiões pericentroméricas e as ilhas CpG na inativação do cromossomo X o que indica uma atividade preferencial para as regiões de cromatina silenciosa (SANTOS; MAZZOLA; CARVALHO, 2005). A função primordial da metilação *de novo* é a geração de uma memória do padrão de expressão de genes estabelecido em embriões, durante todo o desenvolvimento e na vida adulta, incluindo a definição de padrões de *imprinting*. Uma função emergente é o papel fisiológico para manter a estabilidade estrutural dos cromossomos e seu comportamento normal durante as divisões celulares meióticas e mitóticas. Os mecanismos moleculares que

geram os padrões de metilação são ainda pouco compreendidos (SANTOS; MAZZOLA; CARVALHO, 2005).

Em adição à metilação do DNA, alterações nas histonas orquestram a organização do DNA e a expressão gênica (PETERSON; LANIEL, 2004). Enzimas modificadoras das histonas são recrutadas para assegurar que uma região do DNA seja, ou acessível à transcrição, ou que o DNA seja alvo de silenciamento (ESPINO et al., 2005; ELGIN; GREWAL, 2003; HENDRICH et al., 2001). Portanto um “rótulo” epigenético é colocado no DNA alvo, marcando-o com um estado especial que ativa ou silencia genes específicos. Estas modificações reversíveis asseguram que genes específicos possam ser ativados ou silenciados, dependendo de pistas bioquímicas ou desenvolvimentais, tais como níveis hormonais, componente da dieta ou exposição a drogas (ELGIN; GREWAL, 2003; EHRENHOFER-MURRAY, 2004). Os padrões de metilação de DNA também flutuam em resposta à dieta, polimorfismos genéticos herdados e exposição a substâncias do ambiente (LUCH, 2005; SUTHERLAND; COSTA, 2003).

Alterações nos padrões epigenéticos normais podem desregular padrões de expressão gênica o que resulta em diversos desfechos (LEVENSON; SWEATT, 2005; RODENHISER; MANN, 2006; LIU et al., 2009). Por exemplo, em experimentos animais a remoção dos genes que codificam as DNMTs é letal, em humanos a hiperexpressão destas enzimas tem sido ligada a uma variedade de tipos de câncer (SANTOS; MAZZOLA; CARVALHO, 2005). Assim, perturbações nos padrões cuidadosamente organizados de metilação de DNA e modificação de histonas podem causar transtornos congênitos, síndromes pediátricas multissistêmicas, ou predispor as pessoas a doenças como câncer esporádico e doenças neurodegenerativas (RODENHISER; MANN, 2006).

6. EPIGENÉTICA, MEMÓRIA, ENVELHECIMENTO E A DOENÇA DE ALZHEIMER.

Recentemente, novos estudos mostraram que a hipo e a hipermetilação são eventos dinâmicos que podem ocorrer no interior de células, incluindo os neurônios pós-mitóticos. Esses resultados sugerem a existência de mecanismos epigenéticos dinâmicos que podem estar mediando a plasticidade neuronal e sináptica. Por exemplo, a hipometilação de genes específicos de neurônios do hipocampo após a inibição de *DNMT,* bloqueia a potenciação de longo prazo (LEVENSON et al., 2006) e o condicionamento do medo (MILLER; SWEATT, 2007), sugerindo que os acontecimentos do início da vida - especificamente, os cuidados maternos - alteram as respostas ao estresse em adultos através de mudanças de DNA sustentados pela metilação em neurônios do hipocampo de ratos (WEAVER et al.,2005).

Mecanismos epigenéticos podem ser a base causal de disfunção cognitiva. Ao se abordar este tema é importante distinguir entre a necessidade desenvolvimental de mecanismos epigenéticos para a formação normal do SNC e da necessidade de que estes mecanismos sigam ocorrendo como parte do processamento cognitivo na vida adulta (LEVENSON; SWEATT, 2005). Resultados experimentais que serão descritos a seguir (FARAH et al., 2008) demonstraram um papel ativo de mecanismos epigenéticos na formação da memória no adulto.

Mecanismos epigenéticos parecem estar envolvidos na formação e armazenamento de memória e isto pode ter implicações para a doença de Alzheimer. O mecanismo de potenciação de longo prazo é uma forma de transmissão sináptica que ocorre no hipocampo e é à base da memória e do aprendizado. O potencial de longa ação ativado pela ativação dos receptores NMDA é um dos mais conhecidos. A LTP (long term potentiation) pode ser dividida em duas fases: uma precoce que dura poucas horas e independe da síntese de proteína e outra tardia, que dura dias a meses, que depende de síntese proteica. Estas proteínas incluem receptores de glutamato, fatores transcricionais e proteínas estruturais que desenvolvem as sinapses existentes e formam novas conexões (LIU et al., 2009).

Com base na duração de retenção no cérebro a memória pode ser dividida em curto e longo–prazo. A memória de curto prazo é um sistema de capacidade limitada que mantém a informação por um breve período de tempo. Esta memória é geralmente conhecida como “memória operante” que processa a informação para transferi-la para a memória de longo prazo. A formação desta memória de longo prazo requer um processo repetitivo e intensificado de atividade neuronal conhecido como processo de consolidação. A memória de curto prazo não requer síntese proteica, mas apenas modificações em proteínas já existentes, enquanto a formação de memória de longo prazo depende da síntese de proteínas e de novos RNAs. Desta forma, a função neuronal é determinada, em última análise, pela expressão gênica (LIU et al., 2009). A base molecular da memória de longo prazo pode ser entendida através do estudo dos mecanismos regulatórios da expressão gênica na rede neural, que envolve muitas vias sinalizadoras e regulação de vários genes (ROBERSON; SWEATT, 1999; SQUIRE et al., 1975).

Um estudo mostrou que a consolidação da memória contextual de longo prazo no hipocampo ativou a expressão alterada de vários genes (LEVENSON et al., 2004). Estudos clássicos de regulação gênica enfocam elementos regulatórios do DNA e sua interação com fatores transcricionais. Como já descrito anteriormente, nas últimas duas décadas, um dos pontos emergentes de pesquisa sobre controle da regulação gênica tem sido as modificações epigenéticas dos genes e de sua cromatina devido a metilação do DNA. Isto enfatiza a importância da hipótese epigenética que propõe o padrão de metilação de DNA nos neurônios como parte do processo de codificação de memória (HOLLIDAY, 2004).

O DNA das células cerebrais, assim como, das demais células do corpo está sujeito a modificações dinâmicas da metilação. A manutenção da genética e a integridade epigenética parecem ter um papel essencial para células como os neurônios que devem funcionar durante toda a vida. Níveis de metilação do DNA no cérebro sofrem alterações dinâmicas perinatais, o nível de metilação é maior no cérebro adulto do que em outros tecidos. O SNC

parece expressar um nível extremamente alto de *DNMT1,* o qual pode ser necessário para muitas funções cerebrais específicas (LIU et al., 2009).

A remodelação da cromatina pode controlar a transcrição gênica no SNC e modular a formação de memória de longo prazo (LEVENSON et al., 2004; LEVENSON; SWEATT, 2005). Durante o envelhecimento normal ocorre declínio na metilação do DNA em todo o genoma, o que coincide com o declínio funcional da memória e do aprendizado.

Como acima mencionado, o aumento e a diminuição da metilação do DNA têm sido associados ao processo de envelhecimento e têm se acumulado evidências de que as alterações de metilação idade-dependentes estão envolvidas no desenvolvimento de doenças neurológicas, autoimunes e câncer em pessoas idosas (RICHARDSON, 2003).

Recentemente foram sequenciados 24 genes candidatos a envelhecimento saudável, ou seja, genes que estiveram relacionados à possibilidade de o indivíduo viver até os 85 anos ou mais sem desenvolver doenças associadas ao envelhecimento, como a doença de Alzheimer. Vários polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) foram detectados nestes genes. Entre os genes sequenciados estavam os genes das DNA-metiltransferases envolvidos na metilação do DNA (*DNMT1, DNMT3A, DNMT3B* (HALASCHEK-WIENER et al., 2009), as quais são codificadas por genes independentes (HENDRICH; BIRD, 2000).

A enzima mais abundante e responsável pelos padrões de metilação que ocorrem precocemente é a *DNMT1*. Este gene é altamente conservado entre os organismos eucarióticos (SANTOS; MAZZOLA; CARVALHO, 2005). Durante o processo de replicação o padrão de metilação é passado da fita mãe de DNA para a fita-filha. *DNMT1* é a enzima responsável pela manutenção da metilação do DNA, copiando o padrão de metilação da célula-mãe para a célula-filha durante a mitose após cada ciclo de replicação, garantindo, assim, que esses padrões programados de metilação permaneçam através das gerações celulares (TAMMEN; FRISO; CHOI, 2013). Mutações no gene *DNMT1* de ratos conduzem a um aumento desregulado da metilação do DNA e

do silenciamento gênico, sendo a mutação homozigótica desse gene letal no período embriogênico (LI; BESTOR; JAENISCH, 1992). A atividade *de novo* da *DNMT1* em mamíferos parece ser estimulada por estruturas aberrantes de DNA e por 5-metilcitosina em apenas uma cadeia do DNA (SANTOS; MAZZOLA; CARVALHO, 2005).

DNMT3A e *DNMT3B* parecem ser as principais responsáveis pelos padrões de metilação *de novo* durante o desenvolvimento (FENG et al., 2005). *DNMT2* é geralmente considerada como uma metiltransferase de ácido ribonucleico (RNA), embora também tenha atividade de 5-citosina DNA metiltransferase e produz complexos resistentes à desnaturação com o DNA. O grupo metil que é transferido para as citosinas por DNMTs deriva de metiltetrahidrofolato a partir das suas interações com S-adenosilmetionina (SAM) no ciclo de homocisteína-metionina (SANTOS; MAZZOLA; CARVALHO, 2005).

Tem sido proposto que a função da memória possa estar relacionada estreitamente a metilação do DNA nos neurônios (HOLLIDAY, 2000, 2004).

A metilação do DNA e a modificação de histonas têm sido amplamente relacionadas às alterações fenotípicas que ocorrem durante a senescência celular e o envelhecimento de vários organismos e podem estabelecer uma ligação entre o envelhecimento e DA. Além disso, mecanismos epigenéticos foram identificados no desenvolvimento de neurônios e na formação de sinapses. A modificação de histonas é o principal mecanismo controlado por genes específicos, os quais controlam a expressão gênica nos neurônios (SANTOS; MAZZOLA; CARVALHO, 2005).

Vários estudos têm demonstrado que há uma tendência do genoma à hipometilação de DNA em muitos órgãos de vertebrados com a idade, incluindo o cérebro, o fígado, a mucosa do intestino delgado, coração, baço e células de múltiplos tipos, incluindo fibroblastos e linfócitos T. Sendo esse fenômeno estudado em várias espécies de vertebrados, como salmão, camundongos, ratos, vacas e os seres humanos (MASTROENI et al., 2011). Supõe-se que o envelhecimento tenha como consequência natural as alterações dos padrões

de metilação. Assim sendo, mudanças na metilação de regiões específicas do DNA têm sido associadas à diminuição de função de diversos órgãos, memória, densidade óssea dentre outros problemas de saúde relacionados com a idade (TAMMEN; FRISO; CHOI, 2013).

Com a idade ocorre uma perda progressiva de *DNMT1*, que é responsável pela manutenção da metilação do DNA das ilhas CpG, em função disso, tem sido especulado que a progressiva hipometilação de todo o genoma relacionada com a idade pode ser devido aos déficits de *DNMT1* e que o processo global pode servir como um mecanismo de contagem que desencadeia a senescência celular. Aumentos idade-dependentes de S-adenosil-homocisteína (SAH) em relação a S-adenosilmetionina (SAM) podem também desempenhar um papel, uma vez que SAH inibe reações de metilação, incluindo a metilação de DNA. Por sua vez, o declínio geral na metilação do genoma com a idade tem sido associado a processos específicos relacionados com a idade, tais como, eventos patogênicos aberrantes do ciclo celular (por exemplo, apoptose p53-dependente) e o aumento da inflamação que ocorre com o avanço da idade. A hipometilação de regiões não codificadoras e outros locais também ocorre com a idade e foi sugerido que esteja envolvido no processo de envelhecimento (MASTROENI et al., 2011).

No cérebro, os perfis de metilação podem variar substancialmente de uma região para outra e até mesmo de uma sub-região para outra, por exemplo, o giro denteado do hipocampo, ressaltando o valor das comparações regionais do cérebro em estudos epigenéticos de envelhecimento e DA (MASTROENI et al., 2011).

Estudos recentes focam o papel da epigenética na causa de doenças neuropsiquiátricas complexas nos adultos, no autismo e nas doenças neurodegenerativas (ABDOLMALEKY et al., 2004). Metilação aberrante mediada pelos níveis de folato tem sido sugerida como cofator na doença de Alzheimer, há evidência contraditória em relação a hipometilação e hiperexpressão do gene que codifica a presenilinina 1 que está envolvido na plasticidade neuronal, memória a longo termo e sobrevivência neuronal (FUSO

et al., 2005; MULDER et al., 2005). A desregulação da acetilação das histonas também tem sido descrita como relacionada à formação dos depósitos amiloides da DA em estudos experimentais (SASTRE et al., 2001; KIMBERLY et al., 2001; CAO; SUDHOF, 2001; VON ROTZ et al., 2004).

Como observado anteriormente, o metabolismo do folato/ metionina/ homocisteína está criticamente ligado a mecanismos de metilação do DNA. Deficiência de folato em humanos e em modelos animais, por exemplo, resulta tipicamente em hipometilação global que é pelo menos parcialmente reversível com a suplementação de folato. Déficits de folato e alterações no ciclo de metionina / homocisteína foram relatados no envelhecimento e DA e podem, portanto, proporcionar uma base para a tendência do genoma à hipometilação. Apesar de um estudo prospectivo não conseguir encontrar uma associação entre folato, vitamina B12 e vitamina B6 com a incidência de DA, tem sido relatado uma diminuição significativa de folato no líquido cerebroespinal em pessoas com DA. Aumentos no cérebro de SAH e homocisteína no plasma, os quais inibem a metilação do DNA, também foram observados. Homocisteína plasmática elevada tem sido relatada como sendo um fator de risco significativo para a demência. Adicionalmente, a partir de estudos post-mortem realizados no córtex entorrinal de pacientes com DA e controles não-demenciados, utilizando testes de imunorreatividade para 5-metilcitocina, que é um marcador global de metilação do DNA, foi observada uma acentuada redução na metilação de neurônios corticais nos indivíduos com DA comparados aos indivíduos sem a doença (MASTROENI et al., 2011).

Alguns genes que participam do processamento β-amilóide (*PSEN1* e *APOE*) mostraram significativa variabilidade epigenética interindividual que poderia contribuir na predisposição para DA de início tardio. O gene da *APOE* apresentou uma estrutura bimodal, com promotor CpG hipometilado e ilhas 39-CpG altamente metiladas, as quais contém as sequências para o haplótipo ε4 (WANG; OELZE; SCHUMACHER, 2008).

7. DNA-METILTRANSFERASES E VARIABILIDADE GENÉTICA

Como já mencionado anteriormente, a metilação do DNA é responsável pelo mecanismo de silenciamento gênico catalisado por um grupo de enzimas conhecidas como DNA-metiltransferases (DNMTs); *DNMT1, DNMT2, DNMT3A*, *DNMT3B*, e *DNMT3L*. *DNMT3A* e *DNMT3B* são do grupo das *de novo* metiltransferases, ou seja, enzimas que são capazes de metilar sequências CpG anteriormente não metiladas, enquanto *DNMT1* funciona como uma metiltransferase de manutenção, copiando marcas de uma metilação preexistente para uma nova vertente durante a replicação (JELTSCH, 2006).

Embora geralmente considerada uma metilase de manutenção, tem sido demonstrado um funcionamento de *de novo* da *DNMT1* (HIGUCHI et al., 2011).

Além disso, *DNMT3L* é enzimaticamente inativa, mas desempenha um papel importante no estabelecimento de metilação do DNA através do recrutamento ou ativação das *de novo* DNMTs, atuando como um cofator essencial, particularmente, no estabelecimento de impressões de metilação nos gametas (HAGGARTY et al., 2010). *DNMT2* não tem nenhuma atividade metiltransferase detectável, ou tem uma atividade metiltransferase fraca tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Embora tenha sido sugerido que a metilação de DNA no cérebro está envolvida na plasticidade sináptica e estrutural e formação da memória, o envolvimento de DNMTs na fisiopatologia de transtornos de humor é em grande parte desconhecido (HIGUCHI et al., 2011). Os polimorfismos nas DNMTs têm sido associados ao aumento do risco de câncer e à inteligência humana (HAGGARTY et al., 2010), sugerindo que a variação nestes loci genéticos podem ter um papel no risco de doença e de variação da função cognitiva (MURPHY et al., 2012).

O polimorfismo rs2424913 da *DNMT3B* foi estudado por Murphy e colaboradores (2012) no qual os indivíduos que tentaram suicídio (MURPHY et al., 2012) eram mais frequentemente portadores do alelo T, sugerindo que haja uma associação deste alelo com a tentativa de suicídio. Já Coppedé e

colaboradores (2012) investigaram a associação entre polimorfismos da *DNMT3* com DA, pressupondo encontrar resultado positivo e não foi encontrada associação do rs2424913 com DA em uma população de 376 indivíduos da região da Toscana na Itália. Entretanto, na discussão os autores seguem argumentando a favor da possibilidade de polimorfismos funcionais de outras metiltransferases, justificando a falta de associação por possíveis interações entre as diferentes DNA-metiltransferases e as atividades demetilases e as interações entre gene e ambiente que poderiam ter mascarado o efeito da presença de polimorfismos funcionais das *DNMT*s (COPPEDÉ et al., 2012).

Em artigo recentemente publicado pelo nosso grupo de pesquisa (PEZZI et al., 2014) nós testamos a hipótese de que polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em genes envolvidos na regulação epigenética, no caso a *DNMT1* e *DNMT3B*, estivessem associados ao desenvolvimento da doença de Alzheimer. No gene *DNMT1* foram avaliados os polimorfismos rs2162560 (A>G) e o rs759920 (A>G) ambos localizados em íntrons. No caso do SNP rs759920 sua provável funcionalidade indica que ele deva estar envolvido na criação e perturbação de elementos regulatórios do *splicing*. Já no gene da *DNMT3B*, foram avaliados os seguintes polimorfismos: rs998382 (A>G), rs2424913 (C>T) e rs2424932 (A>G). O rs998382 (A>G) está localizado em um íntron, assim como, o rs2424913 (C>T). Já o rs2424932 (A>G) reside na região 3'UTR do gene *DNMT3B* e está localizado em um sítio de ligação de fatores de transcrição e a menor frequência alélica é do alelo A (MURPHY et al., 2012).

O estudo (PEZZI et al., 2014) foi realizado em uma população caucasiana (104 sujeitos com DA e 108 sujeitos saudáveis) todos provenientes da cidade de Porto Alegre. Os indivíduos com DA preenchiam os critérios diagnósticos da NINCDS-ADRDA e do DSM-IV-TR para a doença de Alzheimer. Não foi encontrada nenhuma associação para os polimorfismos avaliados no gene de *DNMT1* (rs759920 e rs2162560), porém os SNPs rs998382 e rs2424913 do gene da *DNMT3B* apresentaram associação com a DA (p=0.005 e p=0.046, respectivamente). Portanto, a presença do haplótipo

TGG da *DNMT3B* aumentou o risco para DA em mais de três vezes (OR = 3.03, 95% IC 1.63 - 5.63, $p < 0.001$). Apesar dos resultados conflituosos com o artigo publicado por Coppedé e colaboradores (2012) devemos levar em conta que a doença de Alzheimer apresenta um padrão complexo de herdabilidade e também a interação do indivíduo com o meio no qual ele está inserido o que poderia justificar esses achados.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOLMALEKY, H.M. et al. Methylomics in psychiatry: Modulation of gene–environment interactions may be through DNA methylation. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet,** v.127, p. 51-9, 2004.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostics and statistical manual of mental disorders, 5ed. Washington, DC: **American Psychiatric Association**, 2013.

BALLARD, C. et al. Alzheimer's disease. **The Lancet**, DOI: dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61349-9, v. 377, n. 9770, p. 1019–1031, Mar. 2011.

BEKRIS, L.M. et al. Review Article: Genetics of Alzheimer Disease, **Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology**, DOI: 10.1177/0891988710383571, v. 23, p. 213, 2010.

BERTRAM, L.; TANZI, R.E. The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. **J. Clin. Invest***,* DOI:10.1172/JCI24761, v.115, p.1449–1457, 2005.

BISHOP, K.S.; FERGUSON, L.R. The Interaction between Epigenetics, Nutrition and the Development of Cancer. **Nutrients**, DOI:10.3390/nu7020922**,** v. *7*, p. 922-947, 2015**.**

BLAZER, D.G.; STEFFENS, D.C. The American Psychiatric PublishingTextbook of Geriatric Psychiatry, 4. ed., Arlington, American Psychiatric Publish, 2009. Disponível em: <http://psychiatryonline.org/book.aspx?bookid=19>. Acesso em: 10 out. 2012.

CAO, X.; SUDHOF, T.C. A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. **Science,** v. 293, p. 115–120, 2001.

CASTELLANI, R.J.; ROLSTON, R.K.; SMITH, M.A. Alzheimer Disease. **NHI Public Acess,** v. 56, n. 9, p.484–546, 2010.

COPPEDÈ, F. et al. DNMT3B Promoter Polymorphisms and Risk of Late Onset Disease. **Current Alzheimer Research**, v. 9, n. 5, p. 550 – 554, 2012.

EHRENHOFER-MURRAY, A. E. Chromatin dynamics at DNA replication, transcription and repair. **Eur J Biochem**, v. 271, p. 2335-49, 2004.

EHRLICH M.; WANG R. Y. 5-Methylcytosine in eukaryotic DNA. **Science**, v**.** 212, p.1350-7, 1981.

ELGIN, S. C; GREWAL, S. I. Heterochromatin: Silence is golden. **Curr Biol**, v. 13, p. 895-8, 2003.

ESPINO, P. S. et al. Histone modifications as a platform for cancer therapy. **J Cell Biochem**, v. 94, p. 88-102, 2005.

FARAH, D. et al. Epigenetic Regulation of *bdnf* Gene Transcription in the Consolidation of Fear Memory**. The Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 42, p. 10576 –10586, 2008.

FENG, J.; CHANG, H.; LI, E.; FAN, G. Dynamic expression of de novo DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b in the central nervous system. **J Neurosci Res**, v. 79, n. 6, p. 734-46, 2005.

FUSO, A. et al. S-adenosylmethionine/homocysteine cycle alterations modify DNA methylation status with consequent deregulation of PS1 and BACE and beta-amyloid production. **Mol Cell Neurosci**, v. 28, p. 195-204, 2005.

HAGGARTY, P. et al. Human Intelligence and Polymorphisms in the DNA Methyltransferase Genes Involved in Epigenetic Marking. **Plos One**, e11329, v. 5, n. 6, 2010.

HALASCHEK-WIENER J. et al. Genetic variation in healthy oldest-old. **Plos One**, v. 4, n. 8, e6641, 2009.

HARDY, J.; MYERS, A.; WAVRANT-DE VRIEZE, F. Problems and solutions in the genetic analysis of late-onset Alzheimer's disease. **Neurodegener Dis**, v. 1, p. 213–17, 2004.

HENDRICH B. et al. Closely related proteins MBD2 and MBD3 play distinctive but interacting roles in mouse development. **Genes Dev,** v. 15, p. 710-23, 2001.

HENDRICH, B.; BIRD, A. Mammalian methyltransferases and methyl-CpG-binding domains: proteins involved in DNA methylation. **Curr.Top. Microbiol. Immunol**, v. 249, p. 55–74, 2000.

HIGUCHI H. et al. State-dependent changes in the expression of DNA methyltransferases in mood disorder patients. **Journal of Psychiatric Research**, v. 45, n. 1295, e1300, 2011.

HOLLIDAY, R. Francis Crick (1916–2004). **Cell,** v. 119, p. 1–2, 2004.

HOLLIDAY, R. Is there an epigenetic component in long-term memory? **J. Theor. Biol**, p. 339–341, 2000.

JELTSCH, A. On the enzymatic properties of DNMT1: specificity, processivity, mechanism of linear diffusion and allosteric regulation of the enzyme. **Epigenetics**, v. 1, n. 2, p. 63-66. 2006.

KATSUNO, M.; TANAKA, F.; SOBUE, G. Perspectives on molecular targeted therapies and clinical trials for neurodegenerative diseases. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psichiatry**. DOI: 10.1136/jnnp-2011-301307, v. 83, p. 329 - 335, 2012.

KIMBERLY, W. T. et al. The intracellular domain of the β-amyloid precursor protein is stabilized by Fe65 and translocates to the nucleus in a Notch-like manner. **J. Biol. Chem,** v. 276, p. 40288–40292, 2001.

LAIRD, P. W.; JAENISCH, R. DNA methylation and cancer. **Hum Mol Genet,** v. 3, p. 1487-95, 1994.

LEVENSON, J. M.; SWEATT, J. D. Epigenetic mechanisms in memory formation. **Nat Rev Neurosci**, v. 6, p.108-18, 2005.

LEVENSON, J. M. et al. Evidence that DNA (cytosine-5) methyltransferase regulates synaptic plasticity in the hippocampus. **J. Biol. Chem,** v. 281, p. 15763–15773, 2006.

LEVENSON, J. M. et al. A bioinformatics analysis of memory consolidation reveals involvement of the transcription factor c-rel. **J. Neurosci.**, v. 24, p. 3933–3943, 2004.

LI, E.; BESTOR, T. H.; JAENISCH, R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. **Cell**, v. 69, p. 915– 926, 1992.

LILLYCROP, K. A. et al. Dietary protein restriction of pregnant rats induces and folic acid supplementation prevents epigenetic modification of hepatic gene expression in the offspring. **The Journal of Nutrition** v. 135, n. 6, p. 1382, 2005.

LIU, C. C. et al. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms, and therapy. **Nat. Rev. Neurol**, DOI: 10.1038/nrneurol.2012.263, v. 9, n. 2, p. 106 - 118, 2013.

LIU, D. et al. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic–pituitary–adrenal responses to stress. **Science,** v. 277, n. 5332, p. 1659, 1997.

LIU, L. et al. DNA methylation impacts on learning and memory in aging. **Neurobiology of Aging**, v. 30, p. 549–560, 2009.

LUCH, A. Nature and nurture — lessons from chemical carcinogenesis. **Nat Rev Cancer**, v. 5, p. 113- 25, 2005.

MASTROENI, D. et al. Epigenetic mechanisms in Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 32, p.1161–1180, 2011.

MCGOWAN, P. O. et al. Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. **Nature Neuroscience**, v. 12, n. 3, p. 342–348. 2009.

MICHAELSON, D. M. APOE ε4: The most prevalent yet understudied risk factor for Alzheimer's disease. **Alzheimer's & Dementia**, v. 10, p. 861 – 868, 2014.
MILLER, C.A.; SWEATT, J.D. Covalent modification of DNA regulates memory formation**. Neuron**, v. 53, p. 857–869, 2007.

MULDER, C. et al. The transmethylation cycle in the brain of Alzheimer patients. **Neurosci Lett** , v. 386, p. 69-71, 2005.

MURPHY, T. M. Genetic variation in *DNMT3B* and increased global DNA methylation is associated with suicide attempts in psychiatric patients. **Genes, Brain and Behavior**, DOI: 10.1111/j.1601-183X.2012.00865.x, 2012.

NETO, M. R. L.; ELKIS, H. Psiquiatria Básica. Porto Alegre: **Artmed**, 2ª edição, 2007.

PATTERSON C. et al. Diagnosis and treatment of dementia: 1. Risk assessment and primary prevention of Alzheimer disease. **CMAJ,** v. 178, n. 5, p. 548-56, 2008.

PETERSON, C. L; LANIEL, M. A. Histones and histone modifications. **Curr Biol**, v. 14, p. 546-51, 2004.

PEZZI, J. C. et al. DNA methyltransferase haplotype is associated with Alzheimer's disease. **Neurosci Lett.** DOI: 0.1016/j.neulet.2014.07.013 v. 5, n. 579, p. 70-4, Set. 2014.

QUERFURTH, H. W.; LAFERLA, F. M. Mechanisms of Disease Alzheimer's Disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 4, 2010.

RICHARDSON, B. Impact of aging on DNA methylation. **Ageing Res Rev**, v. 2, p. 245-61, 2003.

ROBERSON, E. D.; SWEATT, J. D. A biochemical blueprint for long-term memory. **Learn. Mem**, v. 6, p. 381–388, 1999.

ROBERTSON, K. D. DNA methylation and chromatin — unraveling the tangled web. **Oncogene**, v**.** 21, p. 5361-79, 2002.

RODENHISER, D.; MANN, M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. **CMAJ**, v. 174, n. 3, p. 341-8, 2006.

SANTOS, K. F; MAZZOLA, T. N.; CARVALHO, H. F. The prima donna of epigenetics: the regulation of gene expression by DNA methylation. Brazilian **Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 1531-1541, 2005.

SASTRE, M. et al. Presenilin-dependent γ-secretase processing of β-amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch. **EMBO Rep,** v. 2, p. 835–841, 2001.

SQUIRE 2ND, L. R. et al. Inhibitors of cerebral protein synthesis: dissociation of aversive and amnesic effects. **Behav. Biol**., v. 14, p. 335–341, 1975.

SUTHERLAND, J. E.; COSTA, M. Epigenetics and the environment. **Ann N Y Acad Sci**, v. 983, p.151- 60, 2003.

TAMMEN, S. A.; FRISO, S.; CHOI, S. W. Epigenetics: The link between nature and nurture. **Molecular Aspects of Medicine**. DOI.org/10.1016/j.mam.2012.07.018 v. 34, n. 4, p. 753–764, 2013.

VERGHESE, P. B.; CASTELLANO, J. M.; HOLTZMAN, D. M. Roles of Apopoliprotein E in AD and other Neurological Disorders. **Lancet Neurol,** publicado online, DOI: 0.1016/S1474-4422(10)70325-2, v. 10 n. 3, p. 241 – 252, 2011.

VON ROTZ, R. C. et al. The APP intracellular domain forms nuclear multiprotein complexes and regulates the transcription of its own precursor. **J. Cell Sci**, v. 117, p. 4435–4448, 2004.

WANG, S. C.; OELZ, E. B.; SCHUMACHER, A. Age-specific epigenetic drift in late-onset Alzheimer's disease. **PLOS ONE**, v. 3, n. 7, e2698, 2008.

WEAVER, I. C. et al. Reversal of maternal programming of stress responses in adult offspring through methyl supplementation: altering epigenetic marking later in life. **J. Neurosci**. v. 25, p. 11045–11054, 2005.

ZHONG, N.; WEISGRABER, K. H. Understanding The Basis For The Association Of Apoε4 With Alzheimer's Disease: Opening The Door For Therapeutic Approaches. **Curr Alzheimer Res,** v. 6, n. 5, p. 415-418, 2009.

4. OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Avaliar as interações entre os loci dos alelos de *APOE* com os polimorfismos rs998382 e rs2424913 de *DNMT3B* e suas contribuições para o desenvolvimento da DA.

Objetivos Específicos:

Avaliar se o alelo ε4 da *APOE* e o haplótipo TGG da *DNMT3B* demonstra um efeito de risco aditivo e independente para o desenvolvimento da DA.

5. ARTIGO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO

The addictive risk effect of apolipoprotein ε4 and *DNMT3B* haplotype for Alzheimer's disease

Cíntia Monique Boschmann Ens[1], Julio Carlos Pezzi[1], Ericksen Mielle Borba[2], Marcia Lorena Fagundes Chaves[2], Marilu Fiegenbaum[1], Analuiza Camozzato[1]

[1] Graduate Program in Health Science. Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre/RS, Brazil.
[2] Dementia Clinic, Neurology Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre/RS, Brazil.

Corresponding Author:

Rua: Taquara 564/306 Bairro Petrópolis - 90460210 - Porto Alegre – Brazil

Email: anacamoz@gmail.com

Phone 55-51-33353560

Abstract

Background: Alzheimer's disease (AD) is a complex and multifactorial disease with a small individual contribution of several genes and polymorphisms to its development. Among these genes, the *APOEε4* allele has been strongly associated to AD and its relevance as risk factor is already well established. The DNA-methyltransferase enzymes are the main catalyst for methylation - epigenetic mechanism that alters gene expression. Recently, we found an association of the TGG haplotype in the *DNMT3B* gene with AD. We hypothesized that *APOEε4*, and TGG haplotype could independently contribute to AD, thereby increasing the risk.

Methods and Results: The sample was composed of 212 Caucasian subjects (108 healthy controls and 104 with AD by NINCDS-ADRDA and DSM-IV-TR criteria) from southern Brazil. The genetic analyses were performed by real time PCR for TaqMan® assay. Multivariate logistic regression was performed categorizing groups according to the presence or absence of *APOEε4* and/or TGG haplotype as independent variable for outcome AD. The presence of TGG haplotype plus the allele *APOEε4* were strongly associated with the risk of developing AD [OD 11.13; CI 95%(4.25 to 29.16); $p<0.001$]. This association had a higher risk than each factor isolated.

Conclusion: As far as we know, this is the first study that tried to analyze the interaction of *DNMT3B* gene with the *APOEε4* in patients with AD, with interesting findings in the context of the gene interactions studies. The presence of TGG haplotype and *APOEε4* significantly increased the risk of developing the disease.

Keywords: APOEε4; *DNMT3B*; Epigenetics; Alzheimer's disease.

Introduction

Alzheimer disease (AD), the most common form of dementia in the elderly subjects, is considered a complex disease that is influenced by both environmental and genetic mediators. In the sporadic AD, many genetic variations of small effect interact to increase its risk [1]. The apoliprotein E (*APOE*) polymorphisms are the major genetic risk factor for AD, and the highest risk for the disease is associated with ε4 allele [1; 2]. In people over 60 years old *APOE* has been confirmed to enhance the chance of developing sporadic late-onset AD (LOAD), as well as autosomal-dominant familial AD. Approximately 50% of the AD patients are *APOEε4* allele carriers, while in healthy controls the frequency range 20–25% [3] and the genotype of *APOE* ε2/ε2, ε3/ε4, ε4/ε4 confers a risk 0.5, three and eight times greater to developing AD [1]. According to epidemiological and genetics researches, the risk of developing AD in individuals with one *APOEε4* increases in 2-3-fold, while in subjects with two allele copies this risk increases about 12-fold. The presence of the APOEε4 in the Caucasian population with AD is estimated in about 60% and this anticipate in 7 to 9 years per allele copy the onset of the disease [4].

Furthermore, emerging data also have demonstrated that the gene-environment process probably is associated to sporadic AD and provides the hypotheses of epigenetic processes enrolled in this neurodegenerative disease. Epigenetic can explain the interplay of environmental influences and individual genetic susceptibility. Epigenetic mechanisms translate environmental stimuli into modifications in gene expression and can play a pivotal role in aging and the pathogenesis of AD [5; 6]. Epigenetic refers to changes in gene activity independent of primary DNA sequences. The DNA-methyltransferases (DNMTs) are enzymes responsible for catalyzing the methylation of DNA, which is the most common epigenetic mechanism. Methylation occurs by the addition of a methyl group (-CH3) at the 5-carbon of the pyrimidine ring of cytosine, resulting in 5-methylcytosine (5-mC) [7]. Recently, our research group observed that that the carriers of the haplotype TGG in polymorphisms of *DNMT3B* gene showed an association with AD (OR = 3.03, 95% CI 1.63 to 5.63, $p < 0.001$) [8].

Given that *APOE*ε4 is a classic risk factor in the development of AD and the significant association of *DNMT3B* polymorphism with AD (Pezzi et al, 2014) [8], we hypothesized that both genes may have an independent contribution and, therefore, increase the genetic risks for AD. So, the aim of the present study was to evaluate the independent risk of *APOE*ε4 and *DNMT3B* polymorphisms for AD and to examine whether the risk is cumulative if the individual has both risk factors.

Methods and Materials

Study design: case-control study

Data from the current study were derived from a previous study of our research group. That database provided demographic, clinical information and *DNMT3B* haplotype distribution of 212 Caucasian subjects (104 subjects with AD diagnosis according to NINCDS-ADRDA and DSM-IV-TR [9], and 108 healthy subjects) recruited by convenience from a southern Brazilian city. A more detailed sample description can be obtained in Pezzi and cols, 2014 [8]. The DNA was extracted using the Lahiri & Nuremberg protocol (1991) [10] and an amount of DNA were stored in -20º C. For the present investigation we carried out the APOE ε4 genotyping, besides the use of the database already obtained.

The SNPs rs7412 and rs429358 were evaluated in the stored DNA by PCR assays for real-time *APOE*. Genotyping were performed using TaqMan® Genotyping Master Mix and TaqMan SNP Genotyping assays (Applied Biosystems®) to determine the *APOE* haplotypes ε2, ε3 and ε4. Allelic frequencies were obtained by direct counting throughout the genotype frequency.

Frequencies were described as proportions for categorical variables and as mean plus standard deviations for quantitative variables. The non-parametric Mann–Whitney test was used to calculate the differences in age and education between cases and controls. The chi-square association test was used to compare sex between groups.

To investigate the genetic risk for AD, four categories were created according the genetic profile of *DNMT3B and APOE*:

1. Subjects who did not present presented both polymorphism risks (presence of TGG haplotype of *DNMT3B* and *APOE*ε4 allele), this group was considered reference for statistical analysis;

2. Subjects who presented TGG haplotype of *DNMT3B* and who did not have *APOE*ε4 allele;

3. Subjects who did not have TGG haplotype of *DNMT3B* and who have *APOE*ε4 allele;

4. Subjects who presented both polymorphism risks (presence of TGG haplotype of *DNMT3B* and *APOE*ε4 allele.

These categories were entered in a multivariate logistic regression analysis as independent variables for the outcome AD. Confounders entered in the model were age and education, based on literature review.

A two-tailed $P < 0.05$ was considered significant for all analyses. The statistical package SPSS® version 18.0 was used to perform the analyses.

This study was approved by the Ethic Committee (protocol number 566.029) and it was designed to comply with the terms of the Declaration of Helsinki. All participants and, their proxies, for AD subjects, signed the consent form.

Results and Discussion

The comparison of demographic data between AD subjects and healthy controls is showed in Table 1. Individuals with AD showed significantly lower scores on Mini Mental State Examination (MMSE) (P<0.0001) and lower educational level (P<0.0001) than the healthy control subjects.

Insert Table 1 here

Table 2 shows the frequency of each genetic category (according to *DNMT3B* TGG haplotype and *APOEε4* allele) in AD and healthy controls, as well the age, and education adjusted risk of each genetic category for AD. Both genetic risks kept independently their impact on AD. The chance of AD was 3.55 higher given the presence of *DNMT3B* TGG haplotype and absence of *APOEε4* allele compared with absence of *DNMT3B* TGG haplotype and *APOEε4* allele. The odds ratio for AD was even higher (4.75) given the presence of *APOEε4* allele and the absence of *DNMT3B* TGG haplotype compared with absence of *DNMT3B* TGG haplotype and *APOEε4* allele. Subjects with both genetic risk factors (TGG *DNMT3B* haplotype and *APOEε4*) showed a ratio 11.13 higher for AD in comparison with those individuals who did not present any of these genetic risk factors (reference group).

Insert Table 2 here

In a previous study of our research group [8] we observed that the presence of the TGG haplotype in the *DNMT3B* gene increases the risk of AD to 3.55 times. Since the ε4 allele of the *APOE* gene is the most important genetic risk for developing sporadic AD known yet, [2;3;4] we evaluated the gene-gene interaction of these two risk factors. We found an interesting result since the combination of both polymorphisms greatly increased the risk of developing AD (OR = 11.13, 95% CI 4.25 to 29.16, P <0.001), showing the relevance of this interaction.

Alzheimer's disease is considered a multifactorial disease with many factors such as environment, individual and genetic influencing its development [1]. Furthermore, among the myriad of genetic factors, gene variants, for example, SNPs, which are responsible for enormous genetic variability among people, should be also stressed. These variants have a distinct genetic allele frequency between different ethnic groups, constituting the genetic background of each individual, which justifies the study of these variants in different populations. Genetic variants may also be associated with diseases, however, the interaction of different genes and their polymorphisms between themselves, is less studied. *APOE* has a dose-dependent effect. So, in individuals with one copy of APOEε4 allele the risk for developing AD increased up to 3 times, whereas two copies of the allele increased the risk in 8 to 12 times, and when compared to not carriers the disease onset is anticipating in one or two decades [3; 11]. It is suggested that *APOE* may be involved in clearance of soluble Aβ and Aβ aggregation, modulating processes that lead to the accumulation of β-amyloid plaques in the brain. Furthermore, it is responsible for interruption of the normal transport and catabolism of cholesterol necessary for the growth and neuronal repair and regeneration of nerves. Is also associated with immune response, activation of lipolytic enzymes and

vascular diseases affecting the brain [11; 11]. In the present investigation we found an expected risk of *APOEε4* allele, similar to those observed in other studies [3; 4]. However, the magnitude of this risk may vary. For example, no signs of dementia were found in 90-years-old individuals who have the *APOEε4* allele. Further, only about 50% of subjects with AD are *APOEε4* allele carriers, so probably genetic and environmental factors, yet unidentified, are acting [11;13]. Our results showed an increased risk for AD (OR = 11.13, 95% CI 4.25 to 29.16, P <0.001), in those subjects who presented both risk polymorphisms (TGG haplotype of *DNMT3B* plus *APOEε4* allele) stressing the relevance of to analyze gene interactions in complex diseases such as AD.

In this context of gene-gene and gene-environment interaction, epigenetic mechanisms may have a pivotal role in AD pathogenesis [14]. Alterations in risk to disease, in the stress response and metabolism may occur as a consequence of changes in epigenetic patterns. These changes may also be associated with age-related diseases such as cancer and other psychological processes of aging, since the methylation pattern found with aging is similar to that found in cancer, in which occurs the silencing of tumor suppressors genes due to hypermethylation of its promoter [15]. Dynamic epigenetic mechanisms of both hypo- and hypermethylation occur within the cells, even in postmitotic neurons may be mediating the neuronal and synaptic plasticity. The inhibition of *DNMT*s results in hypomethylation of specific genes in the hippocampal neurons that block long-term potentiation [16] and fear conditioning [17]. DNA methylation in neurons appears to play an important role in the encoding process of the memory [18] and the chromatin remodeling can control gene transcription modulating long-term memory formation [19; 20] through the regulation of signaling pathways and regulatory expression of various genes in neural network [21; 22]. Memory consolidation in the hippocampus revealed the activation of gene expression changes in several genes [19]. Aberrant methylation is mediated by folate levels that act as a cofactor in AD, and in post-mortem studies in AD patients was observed a marked reduction in methylation of cortical neurons [23] Aging leads to a process of global hypomethylation of the genome, which coincides with the functional decline of memory and learning.

Recently, Yu et al, (2015) [24] evaluated the association of brain DNA methylation in 28 reported AD loci discovered by GWAS studies with AD pathologies. They found that DNA methylation of CpG islands in genes *SORL1*, *ABCA7*, *HLA-DRB5* and *BIN1* was associated with pathological AD. Additionally, they observed that RNA expression transcripts of *SORL1* and *ABCA7* was associated with paired helical filament tau tangle density, while expression of *BIN1* was associated with amyloid load According to the authors, these data support the hypothesis that methylation has an independent effect on both amyloid process and on tau pathology [24]. These findings may explain the independent and addictive risk of the *DNMT3B* TGG haplotype and of the *APOEε4* allele found in our study, since the first genetic risk factor can also impact other pathways than amyloid route. Moreover, Di Francesco et al, (2015) [25] observed in blood cells of patients with AD an increase in overall DNA methylation and an increase in gene expression and protein levels of *DNMT1* and *DNMT3B* [25].

The DNA-methyltransferases (*DNMTs*) are responsible to carry out the gene methylation, and, as already described above, carriers of the haplotype TGG in polymorphisms of *DNMT3B* gene showed an

association with AD (OR = 3.03, 95% CI 1.63 to 5.63, p <0.001) [8]. In the present study, we observed that the presence of TGG haplotype increased the risk of AD by more than 3-fold and that the increase caused considering only the presence of the *APOE*ε4 allele was about 4.7 times. However, subjects with the presence of both polymorphisms showed an increase risk for AD of more than 11 times. This interaction seems to be independent and addictive. How the interaction between these polymorphisms works in the development of AD should be matter of future investigations.

Despite the statistical significance of our results, one of the limitations of the present study is the small sample size. Therefore, studies with larger population should be performed in order to reach a strong conclusion. Replication of this study in different populations is also suggested, since gene-gene interaction can occur in different ways according to the genetic background found in every ethnic group. In conclusion, in our study we found that the interaction between TGG haplotype of *DNMT3B* gene and allele ε4 of *APOE* is a genetic risk factor that increased the chance of developing AD in 11-fold, suggesting that both factors are independently and addictive. To our knowledge, this is the first study that aimed to investigate the association of *APOEε4* allele with the TGG haplotype in the *DNMT3B* gene in the Alzheimer's disease.

Acknowledgements

Regarding research, article writing and/or publishing the authors state no potential conflict of interests.

Conflict of Interest

We are grateful for the support given to this research by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

References

1. Clement T Loy, Peter R Schofi eld, Anne M Turner, John B J Kwok. (2014) Genetics of dementia. Lancet 383: 828–40 doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60630-3

2. Christian Montag, Lukas Kunz, Nikolai Axmacher, Rayna Sariyska1, Bernd Lachmann1 and Martin Reuter. (2014) Common genetic variation of the APOE gene and personality. BMC Neuroscience. 15(64). doi: 10.1186/1471-2202-15-64

3. Philip B. Verghese, PhD1, Joseph M. Castellano, BS1, and David M. Holtzman, MD (2011) Roles of Apolipoprotein E in Alzheimer's Disease and Other Neurological Disorders. Lancet Neurol. 10(3): 241–252. doi:10.1016/S1474-4422(10)70325-2

4. Daniel M. Michaelson. (2014) APOE ε4: The most prevalent yet understudied risk factor for Alzheimer's disease. Alzheimer's & Dementia, v.10, 861-868 doi.org/10.1016/j.jalz.2014.06.015.

5. Mastroeni, D. Andrew Grover, Elaine Delvaux, Charisse Whiteside, Paul D. Coleman, Joseph Rogers. (2011) Epigenetic mechanisms in Alzheimer's disease. Neurobiology of Aging, v.32, 1161–1180.

6. Wang J, Yu JT, Tan MS, Jiang T, Tan L. (2013) Epigenetic mechanisms in Alzheimer's disease: implications for pathogenesis and therapy. Ageing Res Rev. v.12 (4):1024-41. doi: 10.1016/j.arr.2013.05.003. Epub 2013 May 17.

7. Carlos P Fitzsimons et al. (2014) Epigenetic regulation of adult neural stem cells: implications for Alzheimer's disease. Molecular Neurodegeneration, v.9:25

8. Julio Carlos Pezzi, Cintia Monique Boschmann Ens, Ericksen Mielle Borba, Artur F. Schumacher-Schuh, Fabiana Michelsen de Andrade, Marcia Lorena Fagundes Chaves, Marilu Fiegenbaum, Ana Luiza Camozzato. (2014) DNA methyltransferase haplotype is associated with Alzheimer's disease. Neurosci Lett. v.5, n.579, p.70-4, DOI: 0.1016/j.neulet.2014.07.013.

9. American Psychiatric Association. (2013) Diagnostics and statistical manual of mental disorders, 5ed. Washington, DC.

10. D.K. Lahiri, J.I. Nurnberger, Jr., (1991) A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies, Nucleic Acids Res. v.19, 5444.

11. Celeste M. Karch, Carlos Cruchaga, Alison M. Goate (2014) Alzheimer's disease Genetics: From the Bench to the Clinic. Neuron v.83, doi.org/10.1016/j.neuron.2014.05.041.

12. Donald M. Lyall1, Natalie A. Royle, Sarah E. Harris1, et al. (2013) Alzheimer's Disease Susceptibility Genes *APOE* and *TOMM40*, and Hippocampal Volumes in the Lothian Birth Cohort 1936 . PLoS ONE 8(11): e80513. doi:10.1371/journal.pone.

13. Lynn M. Bekris, Chang-En Yu,Thomas D. Bird, MD, Debby W. Tsuang. (2010) Genetics of Alzheimer Disease, Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology. v. 23, p. 213-227, doi:10.1177/0891988710383571.

14. Diego Mastroeni, Andrew Grover, Elaine Delvaux, Charisse Whiteside, Paul D. Coleman, Joseph Rogers (2010) Epigenetic changes in Alzheimer's disease: decrements in DNA methylation. *Neurobiol Aging*. v.31(12): 2025–2037. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2008.12.005.

15. Stephanie A. Tammen, Simonetta Friso, Sang-Woon Choi (2013) Epigenetics: The link between nature and nurture. Molecular Aspects of Medicine, v. 34, 753–764, doi.org/10.1016/j.mam.2012.07.018.

16. Miller CA, Sweatt JD. (2007) Covalent modification of DNA regulates memory formation. Neuron, v. 53, 857–869.

17. Levenson JM. et al. (2006) Evidence that DNA (cytosine-5) methyltransferase regulates synaptic plasticity in the hippocampus. J. Biol. Chem, v. 281, 15763–15773.

18. Holliday, R. (2004) Francis Crick (1916–2004). Cell, v.119, 1–2.

19. Levenson JM, Choi S, Lee SY , Cao YA, Ahn HJ, Worley KC. Pizzi M. Liou HC, Sweatt JD. (2004) A bioinformatics analysis of memory consolidation reveals involvement of the transcription factor c-rel. J. Neurosci., v.24, 3933–3943.

20. Levenson, J.M.; Sweatt, J.D. (2005) Epigenetic mechanisms in memory formation. Nat Rev Neurosci, v.6, 108-18.

21. Robertson, ED; Sweatt, J (1999) A biochemical blueprint for long-term memory. Learn. Mem., v. 6, 381–388.

22. Squire 2nd, LR; Emanuel, CA; Davis, HP; Deutsch, JA. (1975) Inhibitors of cerebral protein synthesis: dissociation of aversive and amnesic effects. Behav. Biol., v. 14, p. 335–341.

23. Diego Mastroeni, Andrew Grover, Elaine Delvaux, Charisse Whiteside, Paul D. Coleman, Joseph Rogers. (2011) Epigenetic mechanisms in Alzheimer's disease. Neurobiology of Aging, v.32, 1161–1180.

24. Lei Yu; Lori B. Chibnik; Gyan P. Srivastava et al. (2015) Association of Brain DNA Methylation in *SORL1*, *ABCA7*, *HLA-DRB5*, *SLC24A4*, and *BIN1* With Pathological Diagnosis of Alzheimer Disease *JAMA Neurol*. v. 72, n. 1, p. 15-24. doi:10.1001/jamaneurol.2014.3049.

25. Andrea Di Francesco; Beatrice Arosio; Anastasia Falconi; Maria Vittoria Micioni Di Bonaventura; Mohsen Karimi; Daniela Mari; Martina Casati; Mauro Maccarrone; Claudio D'Addario. (2015) Global changes in DNA methylation in Alzheimer's disease peripheral blood mononuclear cells. Brain, Behavior, and Immunity v.45, p.139–144 doi.org/10.1016/j.bbi.2014.11.002

1. **Table 1: Demographic and clinical data: comparison between AD subjects and healthy controls**

Variable	Control Group (N=108)	AD Group (N=104)	*P*
Age (years) (mean/SD)	74.96 (7.73)	76.67 (7.34)	0.099*
Sex (female) N (%)	77 (71)	64 (61.5)	0.146**
Education(years) (mean/SD)	7.95 (4.17)	5.03 (3.06)	<0.001*
MMSE (mean/SD)	27.55 (2.02)	12.72 (5.55)	<0.001*

Note: AD: Alzheimer's disease. MMSE: Mini Mental State Examination score. * Mann-Whitney Test; ** Chi-square Test.

Table 2: Frequencies and education-adjusted risk of each TGG/APOE category for AD: multiple binary logistic regression

Group	Control	Case	Adjusted OR[a] (CI 95%)	P
Reference	49 (45.8%)	15 (15.2%)		
TGG+/APOE-	33 (30.8%)	29 (29.3%)	3.55 (1.57-8.00)	0.002
TGG-/APOE+	12 (11.2%)	20 (20.2%)	4.75 (1.80-12.57)	0.002
TGG+/APOE+	13 (12.1%)	35 (35.4%)	11.13 (4.25-29.16)	<0.001

Reference group: subjects without TGG haplotype and *APOE ε4* allele, [a]OR adjusted by age and education.

CONCLUSÃO

A presente investigação revelou uma importante associação entre o alelo ε4 do gene da *APOE* e o haplótipo TGG do gene *DNMT3B*, mostrando que a presença de ambos os fatores de risco aumentaram o risco de desenvolvimento da DA em mais de 11 vezes, sugerindo que estes fatores são independentes e aditivos. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo que buscou associar estes dois fatores de risco genéticos à DA, obtendo interessantes resultados, mas para que se conheça mais aprofundadamente o mecanismo de interação desses genes e destes com o ambiente é necessário que o estudo seja replicado em uma amostra maior e também que sejam avaliados diferentes grupos étnicos.

ANEXOS

Parecer Constansubstanciado CEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

Plataforma Brasil

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Relação entre Polimorfismos da APOE e das DNA-metiltrasnferases em Pacientes com Doença de Alzheimer e Indivíduos com Envelhecimento Normal

Pesquisador: Analuiza Camozzato de Padua

Área Temática: Genética Humana:
(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 23144813.7.0000.5345

Instituição Proponente: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 566.029

Data da Relatoria: 20/03/2014

Apresentação do Projeto:

A Doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa primária caracterizada por deterioração adquirida da memória e de outras funções cognitivas que leva a morte em 3 a 9 anos após o diagnóstico. Essa doença compromete difusamente o córtex cerebral o que resulta em atrofia cerebral progressiva ¿ que afeta primariamente o hipocampo.Do ponto de vista genético a DA mais comum é a forma de início tardio para a qual existe uma crescente evidência de que estes casos são também influenciados por fatores genéticos. Os genes de risco são geralmente vários, apresentando padrões intrincados de interação entre si e não exibem um único modo de herdabilidade. Assim, a genética destas doenças tem sido chamada de "complexa". Uma hipótese é que estas doenças de genética "complexa" são governadas por variantes comuns de DNA (tais como polimorfismos de nucleotídeo único) e que estas variantes aumentam significativamente o risco, mas são insuficientes para causar a doença. O principal fator de risco genético para o desenvolvimento das placas amiloides na DA de início tardio tem sido relacionado à apolipoproteína E (APOE) que apresenta três formas alélicas: ¿2, ¿3 e ¿4, sendo o alelo ¿4 o que confere maior risco para a doença. A maioria das abordagens analíticas utiliza a análise de associação de marcador único, no

Endereço: Rua Sarmento Leite ,245
Bairro: **CEP:** 90.050-170
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (513)303 -8804 **E-mail:** cep@ufcspa.edu.br

entanto, evidências empíricas de organismos modelo e de estudos em humanos sugerem que as interações entre os loci contribuem amplamente para as características ¿traços¿. Diante disso, ppretendemos genotipar genotipar uma amostra quanto ao perfil do gene da APOE e, assim, associar os achados das DNMTs aos alelos de APOE, com o propósito de observar se em conjunto ambas variáveis têm poder para aumentar o risco para o desenvolvimento da DA.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar se a associação do alelo e4 do gene da APOE com os SNPs de DNMT3b aumentam o risco para a DA.

Objetivo Secundário:

a) Avaliar as interações entre os loci dos alelos de APOE com os polimorfismos de DNMTs e suas contribuições para o desenvolvimento da DA.

b) Armazenamento das amostras de sangue (sob a forma de sangue total e plasma/soro) para serem utilizadas em estudos futuros (Biorrepositório), de acordo com a Conselho Nacional de Saúde na Resolução Nos 196/96 e 441/11 e 340/04 do Comissão Nacional de Ética em Pesquisa.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Adequados à pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Todas as solicitações foram atendidas satisfatoriamente.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados.

Recomendações:

Aprovar o projeto.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pesquisa, atual e relevante.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Início do projeto: abril/2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

Continuação do Parecer: 588.029

entanto, evidências empíricas de organismos modelo e de estudos em humanos sugerem que as interações entre os loci contribuem amplamente para as características ¿traços¿. Diante disso, ppretendemos genotipar genotipar uma amostra quanto ao perfil do gene da APOE e, assim, associar os achados das DNMTs aos alelos de APOE, com o propósito de observar se em conjunto ambas variáveis têm poder para aumentar o risco para o desenvolvimento da DA.

Objetivo da Pesquisa:

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

Continuação do Parecer: 588.029

Término do projeto: março/2016

PORTO ALEGRE, 24 de Março de 2014

Assinador por:
José Geraldo Vernet Taborda
(Coordenador)

Normas da Revista – Molecular Biology Reports

Instructions for Authors – Molecular Biology Reports

Guidelines for Short Communication Articles

1. Article Length: 2,500 words or less

2. References: 25 or less

3. Results and Discussion sections may be combined

4. Figures and/or Tables: 3 or less

5. Article must contain clinical significance

Abstract Format

Max Word Count: 250 words

Format: The abstract should be presented divided into subheadings as follows:

I. Background: Brief summary of basic, relevant background info (2-3 sentences). Rationale and purpose of the study.

II. Methods and Results: Brief explanation of experimental procedure and presentation of significant results. Include sample sizes as well as animal species if applicable.

III. Conclusions: Succinct interpretation of results as well as significance of findings. Statement of the main conclusion of the study. Emphasis should be on new information found during study.

Manuscript Submission

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been

granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Title page

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

- Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.
- LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

References

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].

2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].

3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

- Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. Eur J Appl Physiol 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. N Engl J Med 965:325–329

- Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. J Mol Med. doi:10.1007/s001090000086

- Book

South J, Blass B (2001) The future of modern genomics. Blackwell, London

- Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) The rise of modern genomics, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

- Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1. Accessed 26 June 2007

- Dissertation

Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

- ISSN.org LTWA

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

- EndNote style (zip, 2 kB)

Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibtex file spbasic.bst which is included in Springer’s LaTeX macro package.

Tables

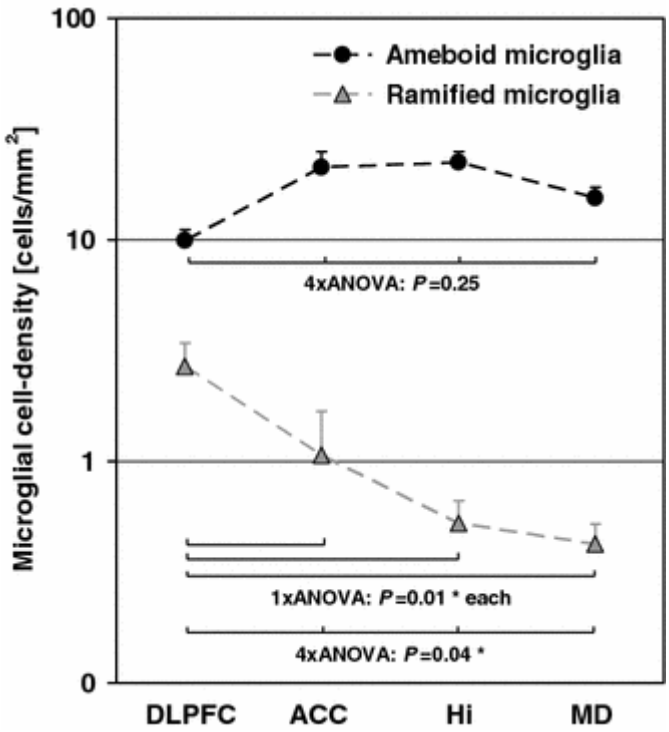
- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Artwork And Illustrations Guidelines

Electronic Figure Submission

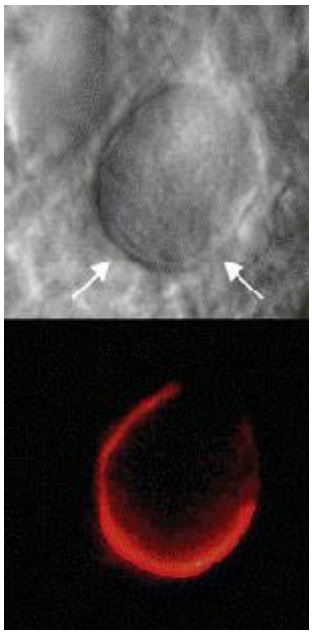
- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art



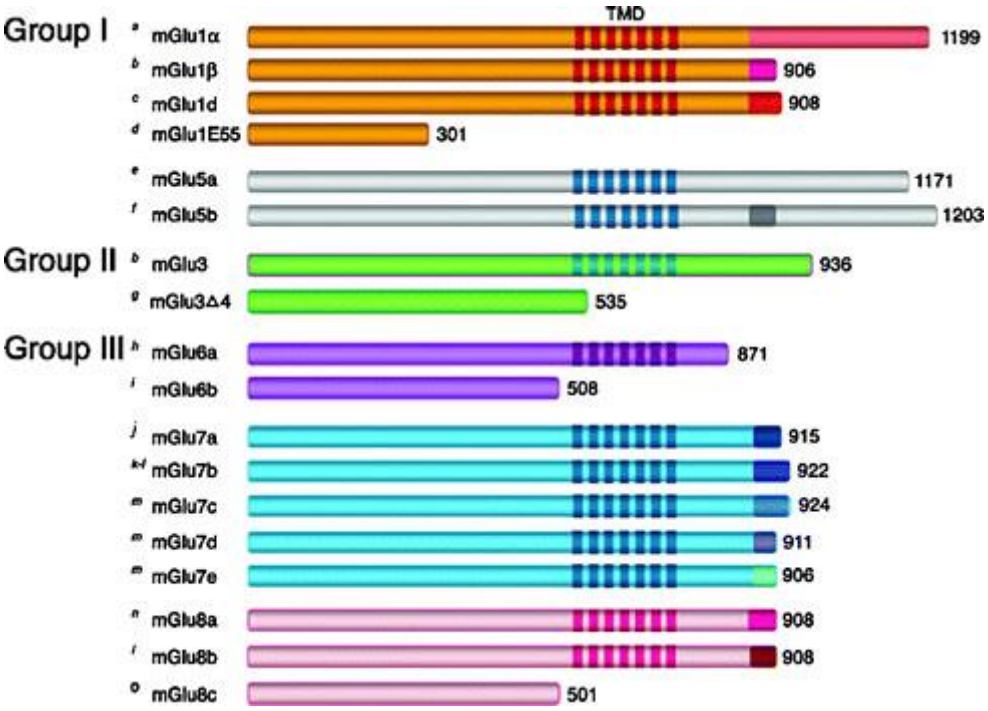
- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art



- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art



- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.

- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.

- Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

Electronic Supplementary Material

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

- Always use MPEG-1 (.mpg) format.

Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

- Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.
- If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

- Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", “... additional data are given in Online Resource 4”.
- Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

Captions

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

- Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

Does Springer provide English language support?

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to have your manuscript edited by a native speaker prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

The following editing service provides language editing for scientific articles in all areas Springer publishes in:

- Edanz English editing for scientists

Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication.

Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment.

- Edanz English editing for scientists

For Authors from China

文章在投稿前进行专业的语言润色将对作者的投稿进程有**所帮助。作者可自愿**选择使用Springer**推荐的**编辑服务，使用与否并不作为判断文章是否被录用的依据。提高文章的语言质量将有助于审稿人理解文章的内容，通过对学术内容的判断来决定文章的取舍，而不会因为语言问题导致直接退稿。作者需自行联系Springer**推荐的**编辑服务公司，协商编辑事宜。

- **理文**编辑

For Authors from Japan

ジャーナルに論文を投稿する前に、ネイティブ・スピーカーによる英文校閲を希望されている方には、Edanz社をご紹介しています。サービス内容、料金および申込方法など、日本語による詳しい説明はエダンズグループジャパン株式会社の下記サイトをご覧ください。

- エダンズグループジャパン

For Authors from Korea

영어 논문 투고에 앞서 원어민에게 영문 교정을 받고자 하시는 분들께 Edanz 회사를 소개해 드립니다. 서비스 내용, 가격 및

신청 방법 등에 대한 자세한 사항은 저희 Edanz Editing Global 웹사이트를 참조해 주시면 감사하겠습니다.

- Edanz Editing Global
- Additional Information
- Authors should suggest six to eight individuals with position, affiliation, country, email address and expertise. To avoid possible bias and conflicts of interest, authors are not allowed to suggest reviewers from the same institute. Non-American authors must list at least four reviewers from outside their country of origin. Papers may be returned without review if authors do not adhere to the above rules

Additional Information

Authors should suggest six to eight individuals with position, affiliation, country, email address and expertise. To avoid possible bias and conflicts of interest, authors are not allowed to suggest reviewers from the same institute. Non-American authors must list at least four reviewers from outside their country of origin. Papers may be returned without review if authors do not adhere to the above rules.

Ethical Responsibilities of Authors

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation can be achieved by following the rules of good scientific practice, which include:

- The manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration.
- The manuscript has not been published previously (partly or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work (please provide transparency on the re-use of material to avoid the hint of text-recycling ("self-plagiarism")).
- A single study is not split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (e.g. "salami-publishing").
- No data have been fabricated or manipulated (including images) to support your conclusions
- No data, text, or theories by others are presented as if they were the author's own ("plagiarism"). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks are used for verbatim copying of material, and permissions are secured for material that is copyrighted.

Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.

- Consent to submit has been received explicitly from all co-authors, as well as from the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute/organization where the work has been carried out, **before** the work is submitted.
- Authors whose names appear on the submission have contributed sufficiently to the scientific work and therefore share collective responsibility and accountability for the results.

In addition:

- Changes of authorship or in the order of authors are not accepted **after** acceptance of a manuscript.
- Requesting to add or delete authors at revision stage, proof stage, or after publication is a serious matter and may be considered when justifiably warranted. Justification for changes in authorship must be compelling and may be considered only after receipt of written approval from all authors and a convincing, detailed explanation about the role/deletion of the new/deleted author. In case of changes at revision stage, a letter must accompany the revised manuscript. In case of changes after acceptance or publication, the request and documentation must be sent via the Publisher to the Editor-in-Chief. In all cases, further documentation may be required to support your request. The decision on accepting the change rests with the Editor-in-Chief of the journal and may be turned down. Therefore authors are strongly advised to ensure the correct author group, corresponding author, and order of authors at submission.

- Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results. This could be in the form of raw data, samples, records, etc.

If there is a suspicion of misconduct, the journal will carry out an investigation following the COPE guidelines. If, after investigation, the allegation seems to raise valid concerns, the accused author will be contacted and given an opportunity to address the issue. If misconduct has been established beyond reasonable doubt, this may result in the Editor-in-Chief's implementation of the following measures, including, but not limited to:

- If the article is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.
- If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction, either an erratum will be placed with the article or in severe cases complete retraction of the article will occur. The reason must be given in the published erratum or retraction note.
- The author's institution may be informed.

Compliance with Ethical Standards

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled "Compliance with Ethical Standards" before the References when submitting a paper:

- Disclosure of potential conflicts of interest
- Research involving Human Participants and/or Animals
- Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the Instructions for Authors carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

Disclosure of potential conflicts of interest

Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflicts of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests **that are directly or indirectly related to the research** may include but are not limited to the following:

- Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number)
- Honoraria for speaking at symposia
- Financial support for attending symposia
- Financial support for educational programs
- Employment or consultation
- Support from a project sponsor
- Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships
- Multiple affiliations
- Financial relationships, for example equity ownership or investment interest
- Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights)
- Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work

In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research.

The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found

- here:

The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s).

See below examples of disclosures:

Funding: This study was funded by X (grant number X).

Conflict of Interest: Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z.

If no conflict exists, the authors should state:

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

After Acceptance

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

- Springer Open Choice

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.