

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA**

CLAYTON FRANCO MORAES

**Associação de marcadores imunogenômicos com a ocorrência
da demência de Alzheimer**

BRASÍLIA-DF

2013

CLAYTON FRANCO MORAES

**Associação de marcadores imunogenômicos com a ocorrência
da demência de Alzheimer**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Médicas.

Orientador: Prof. Dr. Otávio de Tolêdo Nóbrega

BRASÍLIA-DF

2013

“É muito melhor arriscar coisas grandiosas, alcançar triunfos e glórias, mesmo expondo-se à derrota, do que formar fila com os pobres de espírito que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem nessa penumbra cinzenta que não conhece vitória nem derrota.”

Theodore Roosevelt

AGRADECIMENTOS

*“Aqueles que passam por nós,
não vão sós, não nos deixam sós.
Deixam um pouco de si,
levam um pouco de nós.”*
Antoine de Saint-Exupéry

A Deus, nosso Pai Supremo, fonte de todo conhecimento;

À minha esposa Zilda e aos meus filhos Anderson Clayton e Salus Augusto pela tolerância com minhas ausências, o meu incondicional carinho;

Ao meu pai Pedro Lourdes de Moraes, exemplo de persistência e luta, ainda que sozinho, para vencer os imensos obstáculos que a vida lhe ofertou e à minha querida mãe Argelita Franco de Moraes, pelo patrimônio inalienável da integridade moral, marco indelével de seu caráter;

Aos meus queridos tios, Waldevique e Auta, pelo apoio que sempre me sustentou ao longo dos anos de estudos;

Aos meus avós, João Narciso e América, a minha eterna gratidão;

Aos meus carinhosos irmãos Alcione, Márcia, André Luiz, Marcus Túlius, Humberto de Campos e Leandro o meu muito obrigado por terem confiado em meus objetivos;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Otávio de Tolêdo Nóbrega, meu amigo e companheiro, de longa data, que me estendeu a mão e me acompanhou nessa trajetória, me ensinando com desvelo e paciência os caminhos árduos da pesquisa científica;

Ao Prof. Dr. Leopoldo Luiz dos Santos Neto, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília, que com competência e afinco, colocou esta Pós-Graduação em seu devido patamar, meus sinceros agradecimentos;

Ao Dr. Einstein F. Camargos e ao Dr. Marco Polo Dias Freitas, chefes do Serviço de Geriatria do Centro de Medicina do Idoso do Hospital Universitário de Brasília, pelo imenso apoio que nos proporcionaram durante nossas pesquisas acadêmicas;

Aos colegas de jornada Andréa Lessa, Vinícius Carolino, Túlio Lins, Adriane Dallanora, Dayanne Carmo, Wilcelly Machado e Prof. Dr. Rinaldo W. Pereira que contribuíram com os estudos genéticos de nossa pesquisa;

Aos Professores da Pós-Graduação. Foi extremamente prazeroso nosso convívio durante os anos na Universidade;

Aos residentes de Geriatria do Centro de Medicina do Idoso do Hospital Universitário de Brasília, meus agradecimentos pela valiosa colaboração na avaliação dos pacientes geriátricos;

Aos colegas da Pós-Graduação o meu muito obrigado pelo prazer de suas companhias;

Aos pacientes do Centro de Medicina do Idoso da Universidade de Brasília e do Serviço de Geriatria do Hospital da Universidade Católica de Brasília, minha gratidão pela contribuição que me proporcionaram, sem os quais o nosso trabalho não teria logrado êxito.

RESUMO

A Doença de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa com alterações importantes da memória, cuja neuropatologia se caracteriza por placas senis que contêm depósitos extracelulares de proteína β -amilóide, emaranhados neurofibrilares localizados no citoplasma perinuclear, compostos de proteínas Tau hiperfosforiladas e uma extensa perda neuronal. O polimorfismo dos genes da ApoE e das citocinas podem contribuir na fisiopatogenia e/ou progressão da doença. O objetivo do estudo foi avaliar e comparar a frequência dos polimorfismos dos genótipos de indivíduos acompanhados em dois serviços de atenção à saúde do idoso no Distrito Federal, avaliados clinicamente por um período mínimo de dois anos. A casuística foi constituída de 630 indivíduos portadores de demência e com cognição normal. Investigamos os polimorfismos dos genes da ApoE, IL1- α (rs1800587), IL1- β (rs1143627), IL6 (rs1800795), IL8 (rs4073), IL10 (rs1800896), IL12- β (rs3212227), IL18 (rs1946518), TGF- β (rs1800469), TLR-4 (rs4986790) e TNF- α (rs1800629), bem como os níveis de ancestralidade advindos das populações parentais que constituíram o contingente brasileiro, a saber: européia, africana e ameríndia. Foram comparadas as frequências dos genótipos de citocinas entre os pacientes com DA e o grupo controle de acordo com o genótipo de ApoE e do grau de ascendência genética de populações parentais. Nossa pesquisa demonstrou que a associação do SNP -1082 G>A de IL10 com a ocorrência da demência de Alzheimer se mostrou sensível ao nível de ancestralidade genética apresentada pelos indivíduos da amostra, com a proteção conferida pelo alelo A preservada apenas entre aqueles com maior conteúdo africano e menor conteúdo europeu.

SUMMARY

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder with major changes in memory whose neuropathology is characterized by senile plaques containing deposits of extracellular β -amyloid protein, neurofibrillary tangles of the hyperphosphorylated Tau protein in the perinuclear cytoplasm, and extensive neuronal loss. The ApoE and cytokine gene polymorphisms may contribute to the pathogenesis and / or progression of the disease. The aim of the study was to evaluate and compare the frequency of genotypes among individuals from two health care centers for older adults in the Brazilian Federal District, who were clinically followed for a minimum time span of two years. The sample consisted of 630 individuals with dementia or normal cognition. We investigated the classic polymorphisms of the ApoE gene along with on SNP in the IL1- α (rs1800587), IL1- β (rs1143627), IL6 (rs1800795), IL8 (rs4073), IL10 (rs1800896), IL12- β (rs3212227), IL18 (rs1946518), TGF - β (rs1800469), TLR-4 (rs4986790) and TNF- α (rs1800629) genes, and the levels of genetic ancestry from the parental populations that constituted the Brazilian contingent, namely: European, African and Amerindian. Having excluded other forms of dementia, frequencies of cytokine genotypes were compared among AD patients and the control group segregated according to ApoE genotypes and the mean degree of genetic parental ancestry. Our analyses showed an association of the IL10 -1082 G>A SNP with the occurrence of Alzheimer's dementia which was sensitive to the level of genetic ancestry presented by individuals in the sample, with the protection conferred by the A allele preserved only among those with the highest African and lower European contents.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Critérios para o diagnóstico clínico da doença de Alzheimer, segundo NINCDS-ADRDA (MCKHANN et al., 1984).....	16
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descrição dos marcadores inflamatórios estudados, posição cromossômica, número de referência, alelo mais frequente e frequência em Africanos (AFR), Ameríndios (AMR) e Europeus (EUR) em populações parenterais.	33
Tabela 2: Comparação de contínua (média e desvio padrão (SD)) e as variáveis categóricas (número absoluto (n) e proporção (%)) entre pacientes com DA e controle, não dementes, na linha de base.	36
Tabela 3: Análise de frequência dos genótipos investigados de pacientes com DA e controle, sujeitos não dementes.....	38
Tabela 4: Comparação da frequência dos genótipos de IL6 e IL10 dos pacientes com DA e controle, sujeitos não dementes, em subconjuntos de acordo com o genótipo de apo E e grau de ancestralidade genética a partir de populações parentais.	39

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

βA -	peptídeo beta amilóide
ADRDA -	Alzheimer's Disease and Related Disorders Association
AIM -	ancestry informative marker (Marcador Informativo de Ancestralidade)
APA -	American Psychiatric Association
ApoE -	apolipoproteína E
APP -	amyloid precursor protein (proteína precursora amilóide)
CALM -	clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia
CDR -	Clinical Dementia Rating (Escala de avaliação da gravidade da demência)
CLU -	clusterina
CMI -	Centro de Medicina do Idoso
CR1 -	receptor do complemento 1
DA -	doença de Alzheimer
DCL -	demência de corpos de Lewy
DFT -	demência frontotemporal
DSM-IV -	Manual Diagnóstico e Estatístico de Doenças Mentais, quarta edição
DV -	demência vascular
GWA -	genome-wide association studies
HUB -	Hospital Universitário de Brasília
IL -	interleucina
IQCODE -	Informant Questionnaire on Cognitive Decline in the Elderly
MAPs -	Microtubule Associated Proteins
MEEM -	Mini Exame do Estado Mental
NINCDS -	National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke
PAD -	pressão arterial diastólica
PAS -	pressão arterial sistólica
PICALM -	phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein
SNP -	single nucleotide polymorphism (polimorfismo de base única)
TGF -	fator de crescimento transformante
TLR-4 -	toll like receptor 4
TNF -	fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. Síndrome demencial	11
1.2. Doença de Alzheimer	12
1.3. Diagnóstico da doença de Alzheimer	14
1.4. Testes de apoio ao diagnóstico	17
1.5. Genética e doença de Alzheimer	18
1.6. Neuroinflamação e Interleucinas	23
1.7. Polimorfismos de citocinas e doença de Alzheimer	27
2. OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo geral	30
2.2 Objetivos específicos	30
3. METODOLOGIA	31
3.1 Amostra estudada	31
3.2 Análise Genética	33
3.3 Análise Estatística	35
4. RESULTADOS	36
5. DISCUSSÃO	40
6. CONSIDERAÇÕES	43
REFERÊNCIAS	44
ANEXOS	55
Anexo 1 - Termo de consentimento livre e esclarecido	56
Anexo 2 – Parecer de aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília-DF em 25 de Junho de 2009 sob o número CEP-FM 016/2009.	57
Anexo 3 - Aprovação da FAPDF.	58
Anexo 4 – Ficha clínica (admissão).	59
Anexo 5 - Artigo científico aceito pelo periódico Neuroimmunomodulation.	61
Anexo 6 - Produção científica durante o Doutorado.	79

1. INTRODUÇÃO

1.1. Síndrome demencial

Com o aumento da expectativa de vida e controle da natalidade, o envelhecimento populacional tornou-se realidade, trazendo consigo uma maior prevalência de doenças crônico-degenerativas, dentre elas as síndromes demenciais. A definição de demência, segundo a quarta edição do Manual de Diagnóstico e Estatística das Perturbações Mentais (DSM-IV) da *American Psychiatric Association (APA)*, inclui a presença de declínio de memória associado ao déficit de, pelo menos, outra função cognitiva (linguagem, gnosis, praxias ou funções executivas) com intensidade suficiente para interferir no desempenho social ou profissional do indivíduo. Por ser uma condição adquirida, distingue-se do retardo mental e, por sua persistência, distingue-se do *delirium* (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 1994).

O diagnóstico sindrômico de demência está diretamente associado à avaliação cognitiva e funcional do indivíduo. Para a análise cognitiva global, o Mini Exame do Estado Mental - MEEM (*Mini Mental State Examination*) constitui o teste recomendado, tendo importante papel quanto ao rastreamento (FOLSTEIN, M.; FOLSTEIN, S.; MCHUGH, 1975). Avaliações mais específicas das funções cognitivas podem ser obtidas mediante testes breves, de fácil e rápida aplicação pelo clínico, como os de memória (evocação tardia de listas de palavras ou de figuras, por exemplo), os de fluência verbal (número de animais em um minuto) e desenho do relógio. Para a avaliação funcional, recomenda-se o *Informant Questionnaire on Cognitive Decline in the Elderly (IQCODE)*, o questionário de Pfeiffer ou a escala Bayer de atividades da vida diária. Um exame neurológico minucioso, aliado a exames laboratoriais e de neuro-imagem, complementam a avaliação clínica inicial (NITRINI et al., 2005).

Na literatura, encontram-se inúmeras classificações propostas para as síndromes demenciais. Uma delas, comumente adotada, é a que distingue dois grupos: *i*) o grupo das demências degenerativas (ou primárias), que inclui a doença de Alzheimer (DA), a demência por corpos de Lewy (DCL) e a demência frontotemporal (DFT), dentre outras; e *ii*) o grupo das demências não-degenerativas (ou secundárias), o qual abrange inúmeros subtipos, destacando-se a demência vascular (DV), as demências priônicas, as demências hidrocefálicas, as demências por lesões expansivas intracranianas e as demências toxicometabólicas (VALE, 2005). As demências possuem diagnósticos baseados em variáveis comportamentais e cognitivas, e não podem ser determinadas por tomografia computadorizada do crânio, eletroencefalografia ou outros testes laboratoriais, apesar de que os mesmos devam ser realizados com o intuito de excluírem outras causas de demência (MCKHANN et al., 1984).

A prevalência média de demência em indivíduos acima dos 65 anos de idade varia entre 2,2% na África, 5,5% na Ásia, 6,4% na América do Norte, 7,1% na América do Sul e 9,4% na Europa (LOPES; BOTTINO, 2002). Estima-se que existam 36 milhões de pessoas com demência no mundo (WORLD ALZHEIMER REPORT, 2011). Recente estudo colaborativo na América Latina apresenta prevalência mais elevada de demência entre indivíduos relativamente mais jovens (entre 65 e 69 anos) quando comparado às regiões desenvolvidas. Uma possível explicação para isso é a associação entre baixa reserva cognitiva e baixo nível educacional nos países latino-americanos, causando, portanto, sinais clínicos de demência mais precocemente nessa população (NITRINI et al., 2009).

No Brasil, uma pesquisa realizada por Herrera e colaboradores (2002) encontrou prevalência de demência de 7,1% em indivíduos acima de 65 anos de idade. A doença de Alzheimer foi responsável por 55,1% dos casos; enquanto a demência mista (doença de Alzheimer associada à doença cerebrovascular) ocasionou 14,4% e a demência vascular (DV), 9,3% dos fenótipos demenciais. A demência frontotemporal (DFT) e a demência com corpos de Lewy (DCL) responderam, respectivamente, por 2,6 e 1,7% dos casos.

Almeida e colaboradores (2009), do Grupo de Pesquisa em Neurologia Cognitiva e do Comportamento da Universidade Federal de Minas Gerais, ratificaram a DA como a síndrome demencial mais prevalente, e estimaram em 12% a

prevalência de epilepsia em pacientes com demência, considerando todas as síndromes demenciais.

1.2. Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer é uma doença de etiologia complexa devido a interações entre componentes ambientais e genéticos (HAROLD et al., 2009; ROGAEVA, 2002). A DA é uma enfermidade progressiva com maior prevalência em idosos, haja vista que a idade cronológica figura como principal fator de risco para sua ocorrência. O quadro neuropatológico da DA caracteriza-se por redução do número de neurônios e sinapses acompanhadas por duas lesões características principais: placas senis e emaranhados neurofibrilares.

Dentre os diversos elementos relacionados ao processo degenerativo cerebral verificado na DA, destaca-se a participação da proteína precursora amilóide (APP), cujo papel patogênico ocorre quando há acúmulo de seu produto, o peptídeo β -amilóide (β A), no cérebro de indivíduos afetados. O processamento da APP resulta em fragmentos β -amilóide de 40 e 42 aminoácidos, respectivamente. O fragmento de 42 resíduos de aminoácidos possui propriedade neurotóxica porque seu acúmulo implica na formação de fibras amilóides e, por decorrência, placas senis.

Estudos sugerem que a redução no nível ou atividade dos fragmentos de APP, juntamente com o acúmulo da variante de 42 aminoácidos de β A (β A42), poderiam ter um papel crítico na associação da disfunção cognitiva associada à DA, particularmente em estágios precoces da doença (TURNER et al., 2003). O peptídeo fibrilar β A é depositado extracelularmente em forma de placas, nas amígdalas, hipocampo e neocórtex de indivíduos afetados pela doença (HAASS; SELKOE, 2007). Fragmentos intracelulares de APP ligam-se a fatores de transcrição e são transportados para o núcleo, onde passam a influenciar a transcrição (LAFERLA; GREEN; ODDO, 2007). A regulação da proteólise de APP é dependente da atividade de um complexo protéico multimérico, cujos principais componentes são as presenilinas, a nicastrina, PEN-2 e APH-1 (GASSEN; ANNAERT, 2003).

A observação de emaranhados neurofibrilares intracelulares e a identificação da proteína tau, uma proteína da família das MAPs (*Microtubule Associated*

Proteins), como unidade formadora destes emaranhados, deram suporte à hipótese de que uma degeneração do citoesqueleto neuronal pudesse estar envolvida na patogenia da DA (GOLDE, 2006).

A tau é uma proteína, cuja principal função bioquímica consiste na estabilização dos microtúbulos, estando envolvida na regulação da polimerização e despolimerização dos mesmos durante o processo de extensão axonal. Atua ligando-se às unidades de tubulina, possibilitando, desta forma, a organização em hélice das fibras, e o conseqüente crescimento/alongamento dos microtúbulos. Sua atividade é regulada, a nível pós-traducional, por mecanismos de fosforilação e desfosforilação (DRECHSEL et al., 1992). Sob a ação de enzimas cinases diversas, tais como a glicogênio sintetase kinase 3 β (GSK-3 β), a proteína tau pode ser hiperfosforilada, processo que compromete a ligação desta proteína à tubulina e, conseqüentemente, leva a uma desestabilização/desestruturação dos microtúbulos, bem como à fibrilação e deposição intracelular da proteína tau na forma de emaranhados neurofibrilares (HERNÁNDEZ; AVILA, 2007; IQBAL et al., 2005; SUH; CHECLER, 2002).

Presume-se que a fosforilação da proteína tau é um pré-requisito para a sua agregação; porém, uma possibilidade alternativa é que a tau agrega-se antes de se tornar fosforilada, levando a um estado conformacional alterado capaz de proteger o depósito tau da ação de fosfatases (HANGER; ANDERTON; NOBLE, 2009). Além disso, exibe conformações anormais e torna-se agregada, resultando em neurofibrilas. O envolvimento da tau nos processos neurodegenerativos que levam à DA e taupatias relacionadas encontra-se bem estabelecido; entretanto, o papel da fosforilação em tais transtornos é incerto.

A partir desses dados, fica claro que fragmentos de APP, incluindo β A 42, exercem uma poderosa regulação em funções neuronais básicas, como excitabilidade celular e transmissão sináptica, com repercussões clínicas importantes sobre a regulação de comportamentos e, também, com aprendizado e memória (TURNER et al., 2003).

Estudos de prevalência projetavam para o ano de 2000, nos Estados Unidos da América (EUA), 4,5 milhões de pessoas com DA. No entanto, no ano de 2010, o número de pessoas com DA atingiu 5,2 milhões (BROOKMEYER et al., 2011). A proporção de indivíduos com DA dobra aproximadamente a cada cinco anos entre indivíduos com sessenta anos de idade ou mais, representando 1% aos sessenta

anos e em torno de 30% aos 85 anos (JORM, 1991). Sem avanços no tratamento, há previsão de que o número de casos sintomáticos de DA, nos EUA, aumentará para 13,2 milhões até 2050 (BROOKMEYER et al., 2011), sendo estimado um alto custo para o cuidado dos pacientes (WIMO; WINBLAD, 2001).

As taxas de incidência de DA nas populações mundiais têm mostrado grande variabilidade, desde 3,2 casos por 1.000 pessoas-ano, na Índia, a 25,2 em Indianópolis, nos EUA (CHANDRA et al., 2001; HENDRIE et al., 2001). No Brasil, três estudos investigaram as prevalência e incidência desta doença, utilizando amostras de idosos de base comunitária e critérios diagnósticos atuais (HERRERA et al., 2002; NITRINI et al., 2004; CHAVES et al., 2009). A prevalência de demência na população com mais dos 65 anos foi de 7,1%, sendo que a DA foi responsável por 55% dos casos (HERRERA et al., 2002). A taxa de incidência foi 7,7 por 1.000 pessoas-ano no estudo de São Paulo (NITRINI et al., 2004) e 14,8 por 1.000 pessoas-ano no estudo do Rio Grande do Sul (CHAVES et al., 2009).

Considerando a prevalência de demência no Brasil e a população de idosos de aproximadamente 15 milhões de pessoas, há estimativa de que cerca de 1,1 milhões de idosos sejam portadores sintomáticos da demência de Alzheimer no presente momento.

1.3. Diagnóstico da doença de Alzheimer

Em 1994, foi composto um comitê pelo *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke* (NINCDS) e pela *Alzheimer's Disease and Related Disorders Association* (ADRDA) com a intenção de estabelecer e descrever critérios clínicos para o diagnóstico da doença de Alzheimer, visando, principalmente, os protocolos de pesquisas e a descrição de procedimentos que poderiam ser úteis para avaliar e acompanhar a história natural da doença (MCKHANN et al., 1984). Esses parâmetros foram revistos em 1999, baseados em evidências científicas, com relação à sua sensibilidade e especificidade, por um subcomitê da Academia Americana de Neurologia (KNOPMAN et al., 2001).

Um critério diagnóstico amplamente difundido consiste no Manual Diagnóstico e Estatístico de Doenças Mentais, quarta edição, também denominado DSM-IV

(AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 1994), que apresenta alta fidedignidade e aplicabilidade, sendo preconizado como instrumento útil para a rotina clínica. Com o uso dos critérios clínicos padronizados pelo NINCDS-ADRDA e pelo DSM-IV, a consistência do diagnóstico entre a primeira visita e após um ano de seguimento clínico é alta (FORETTE et al., 1989).

Estudos que avaliaram a acurácia do diagnóstico clínico de DA, utilizando-se conjuntamente dos critérios DSM-IV e NINCDS-ADRDA, atingiram um grau de sensibilidade média de 81% (amplitude de 49 a 100%) e especificidade média de 70% (amplitude de 47 a 100%) (KNOPMAN et al., 2001). As utilizações combinadas destes critérios podem aumentar a precisão clínica do diagnóstico da doença de Alzheimer.

O diagnóstico de uma entidade clínica complexa como a DA certamente se beneficia de um procedimento de investigação clínica pautada, sobretudo, na exclusão de causas secundárias de transtornos demenciais. Neste sentido, pacientes recém admitidos e com sinais e sintomas compatíveis com a DA são normalmente diagnosticados como portadores de possível DA. Mediante uma investigação clínica para a exclusão de causas secundárias, o diagnóstico de provável DA pode ser feito se houver uma história típica de início insidioso de demência, e quando não houver outra doença sistêmica ou cerebral que possa justificar o déficit cognitivo. Entre as doenças que devem ser excluídas estão a depressão, doença de Parkinson, demência vascular, intoxicação por drogas, doença tireoideana, lues cerebral, hematoma subdural, hidrocefalia, doença de Huntington, neoplasias cerebrais, doença de Creutzfeldt-Jakob e outras doenças crônicas. No entanto, cabe ressaltar que o diagnóstico definitivo de doença de Alzheimer necessita de confirmação histopatológica do tecido cerebral (Quadro 1).

Quadro 1: Critérios para o diagnóstico clínico da doença de Alzheimer, segundo NINCDS-ADRDA (MCKHANN et al., 1984).

<p>I. Critérios para o diagnóstico clínico de doença de Alzheimer PROVÁVEL:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Demência estabelecida por exame clínico e documentada pelo Mini Exame do Estado Mental, escala de demência de Blessed, ou avaliação similar, e confirmada por testes neuropsicológicos; 2) Déficits em duas ou mais áreas da cognição; 3) Piora progressiva da memória e outras funções cognitivas; 4) Ausência de distúrbio da consciência; 5) Início entre os 40 e 90 anos, mais frequentemente após os 65 anos; e 6) Ausência de doenças sistêmicas ou outras doenças cerebrais que por si só possam provocar declínio progressivo de memória e cognição.
<p>II. O diagnóstico de doença de Alzheimer PROVÁVEL é auxiliado por:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Deterioração progressiva de funções cognitivas específicas como linguagem (afasia), habilidade motora (apraxia) e percepção (agnosia); 2) Prejuízo nas atividades do dia-a-dia e padrões anormais de comportamento; 3) História familiar de demência (particularmente se confirmada por exame neuropatológico); 4) Exames laboratoriais compatíveis com o diagnóstico: <ol style="list-style-type: none"> a) Punção lombar: normal, pelas técnicas usuais; b) EEG: padrão normal ou alterações inespecíficas, como o aumento de ondas lentas; c) TC de crânio: atrofia cerebral, com progressão documentada por exames seriados.
<p>III. Outras características clínicas consistentes com o diagnóstico de doença de Alzheimer PROVÁVEL, após exclusão de outras causas de demência, incluem:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) “Platôs” no curso progressivo da doença; 2) Sintomas associados: depressão, insônia, incontinência, delírios, ilusões, alucinações, incontinência verbal, explosões emocionais, agitação, distúrbios sexuais, perda de peso; 3) Outras anormalidades neurológicas, observadas em alguns pacientes, especialmente com doença avançada e incluindo sinais motores, aumento de tônus muscular, mioclonias ou distúrbio da marcha; 4) Convulsões em doença avançada; 5) TC de crânio normal para a idade.
<p>IV. As características que tornam o diagnóstico de doença de Alzheimer PROVÁVEL incerto ou pouco provável incluem:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Início abrupto; 2) Sinais neurológicos focais (tais como hemiparesia, déficits sensitivos, déficits em campos visuais, distúrbio da coordenação motora) no início do curso da doença; 3) Convulsões ou distúrbios da marcha nos estágios iniciais da doença.
<p>V. Diagnóstico clínico de POSSÍVEL doença de Alzheimer:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Pode ser feito com base na síndrome demencial, na ausência de outra alteração neurológica, psiquiátrica ou sistêmica suficiente para causar a demência, e na presença de variação no início, apresentação ou curso clínico; 2) Pode ser feito na presença de uma segunda doença sistêmica ou neurológica suficiente para produzir demência, a qual não é considerada como a causa da demência; 3) Deve ser usado em estudos de pesquisa quando um único e gradualmente progressivo déficit cognitivo grave for determinado, na ausência de outras causas identificadas.
<p>VI. Critérios para diagnóstico DEFINITIVO da doença de Alzheimer:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Critério clínico para provável doença de Alzheimer; 2) Evidência histopatológica obtida por biópsia/autópsia.

1.4. Testes de apoio ao diagnóstico

Mini Exame do Estado Mental

O Mini Exame do Estado Mental (MEEM) é composto por diversas questões agrupadas em sete categorias: orientação temporal (cinco pontos), orientação espacial (cinco pontos), registro de três palavras (cinco pontos), atenção e cálculo (cinco pontos), lembrança das três palavras (três pontos), linguagem (oito pontos) e capacidade visuoespacial (um ponto). A pontuação do MEEM pode variar de um mínimo de zero até um total máximo de trinta pontos. A escala é de uso simples e pode ser facilmente administrada entre cinco e dez minutos, inclusive por profissionais não-médicos (ALMEIDA et al., 1998). O MEEM é uma escala de rastreamento cognitivo com boa correlação com a evolução do processo demencial, desde que levado em conta o grau de instrução do indivíduo para o ajuste dos pontos de corte (LAKS et al., 2003; ALMEIDA et al., 1998; BERTOLUCCI et al., 1994).

Segundo Bertolucci e colaboradores (1994), os níveis de sensibilidade e especificidade para as demências em geral foram os seguintes:

- (a) Analfabetos: escore de corte de 13, com sensibilidade de 82,4% e especificidade de 97,5%;
- (b) Indivíduos com baixa (1 a 4 anos) e média escolaridade (4 a 8 anos incompletos): escore de corte de 18 (sensibilidade de 75,6% e especificidade de 96,6%);
- (c) Indivíduos com alta escolaridade (acima de 8 anos): escore de corte de 26 (sensibilidade de 80% e especificidade de 95,6%).

Clinical Dementia Rating (CDR) – Escala de avaliação da gravidade da demência

A escala de avaliação da gravidade da demência, *The Washington University Clinical Dementia Rating* (CDR) vem sendo amplamente usada em estudos

longitudinais para estagiar a gravidade da doença de Alzheimer (HUGHES et al., 1982). A escala CDR é derivada de um questionário semiestruturado com o paciente e um informante apropriado e quantifica a alteração em cada uma das seis categorias cognitivas (memória, orientação, julgamento, capacidade de resolver problemas, tarefas comunitárias, domiciliares e cuidado pessoal), em uma escala de cinco pontos. A memória é considerada a categoria principal, e as outras, secundárias. Se CDR=0, significa ausência de demência; CDR=0,5, CDR=1, CDR=2 ou CDR=3 indicam, respectivamente, demência questionável, leve, moderada ou grave. A vantagem desta escala é que ela é baseada em dados clínicos e relativamente independentes de testes psicométricos. As seis categorias usadas para classificar a gravidade da demência estão diretamente ligadas à validade dos critérios diagnósticos clínicos para a DA (MORRIS, 1993). Há grande reprodutibilidade tanto entre o pessoal médico (BURKE et al., 1988) como não-médico da área da saúde (MCCULLA et al., 1989).

Escala de Isquemia de Hachinski

O escore de isquemia de Hachinski (HACHINSKI et al., 1975) procura quantificar a probabilidade da etiologia do quadro demencial ser de origem degenerativa ou vascular, por meio da presença de alguns sinais e sintomas (confusão noturna, sintomas e sinais neurológicos focais, labilidade emocional, etc.), bem como a presença ou evolução de algumas entidades patológicas (hipertensão arterial, arteriosclerose, deterioração em degraus etc.). Um escore de quatro ou menos sugere que o quadro demencial é predominantemente degenerativo, sendo pouco provável a etiologia vascular. Quando igual ou superior a sete é de etiologia vascular. Escore cinco e seis sugere demência mista.

1.5. Genética e doença de Alzheimer

Para além do gene da apolipoproteína E (ApoE), recentes estudos de genética molecular atribuem a novos genes uma participação na etiologia da DA de

início tardio: clusterina (CLU), PICALM e receptor do complemento 1 (CR1) (HAROLD et al., 2009; LAMBERT et al., 2009).

A partir de 2007, uma série de pesquisas no ramo de epidemiologia genética teve o foco de suas investigações voltado para uma abordagem que envolve a varredura em toda a extensão do genoma, utilizando centenas de milhares de polimorfismos de base única (*Single Nucleotide Polimorphisms* - SNPs) para encontrar variações genéticas associadas a fenótipos específicos. Esse tipo de pesquisa é hoje conhecido como estudos associativos de SNPs por varredura genômica (*Genome-wide association studies* – GWAS).

Estudos recentes resultaram em um notável aumento dos locos genéticos envolvidos com a doença de Alzheimer e outras demências, tendo se destacado nos últimos anos como uma ferramenta promissora na investigação de fenótipos complexos. Esses estudos têm por objetivo buscar, em centenas ou milhares de indivíduos, polimorfismos comuns com associações nunca antes descritas, em genes ou regiões genômicas que nunca foram candidatos na etiologia de uma determinada doença.

Com relação à DA, o catálogo público do *National Human Genome Research Institute* (NHGRI, ano) tem arquivado, desde 2008, dezesseis artigos utilizando essa metodologia (FEULNER et al., 2010; KRAMER et al., 2010; NAJ et al., 2010; SESHADRI et al., 2010; BEECHAM et al., 2009; CARRASQUILLO et al., 2009; HAROLD et al., 2009; HEINZEN et al., 2009; LAMBERT et al., 2009; PODUSLO et al., 2009; ABRAHAM et al., 2008; BERTRAM et al., 2008; LI et al., 2008; WEBSTER et al., 2008; COON et al., 2007; REIMAN et al., 2007). Ao todo foram descritos 22 SNPs com fortes associações.

Apolipoproteína E

A apolipoproteína E (ApoE) é uma glicoproteína com 317 aminoácidos, peso molecular de 34 kDa, e é uma das principais proteínas presentes no plasma humano. Consiste em uma das várias classes diferentes de apolipoproteínas, incluindo ApoA, ApoB, ApoC, ApoD e ApoJ (clusterina) que são moduladores das interações entre lipoproteínas e células, enzimas e outras lipoproteínas.

A sequência da região codificadora do gene ApoE, localizado no cromossomo 19q13.2, é polimórfica, sendo os principais alelos conhecidos como $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$. As várias combinações possíveis de dois dos três alelos principais podem dar origem a seis possíveis genótipos: ApoE $\epsilon 2/\epsilon 2$, ApoE $\epsilon 3/\epsilon 3$, ApoE $\epsilon 4/\epsilon 4$, ApoE $\epsilon 2/\epsilon 3$, ApoE $\epsilon 3/\epsilon 4$ e ApoE $\epsilon 2/\epsilon 4$.

Pesquisas relacionadas à ApoE verificaram que seus alelos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$ são fatores de risco variáveis nas diferentes etnias (VENKETASUBRAMANIAN, 2010). O alelo $\epsilon 4$ é um conhecido fator de risco para o desenvolvimento da DA em caucasianos e hispânicos, sendo o risco diminuído em afro-americanos e nulo em nigerianos. Além disso, o alelo $\epsilon 2$ parece ser minimamente protetor em caucasianos e indiferente ou mais predisponente em afro-americanos (VENKETASUBRAMANIAN, 2010; MURREL, 2006; OGUNNIYI, 2000; TANG, 1996). No entanto, ainda não está devidamente esclarecido se a diferença encontrada é decorrente de variações metodológicas ou ambientais.

Gene Clusterina

A clusterina (CLU), ou apolipoproteína J (ApoJ), é uma proteína cujo gene encontra-se em 8p21–p12 e apresenta altos níveis transcricionais no fígado, ovários, testículos e cérebro (GUERREIRO et al., 2010). Conforme o referido autor, é considerada uma glicoproteína enigmática, pois apresenta uma distribuição tecidual quase onipresente e um aparente envolvimento nos processos biológicos que vão desde a involução da glândula mamária, ao transporte lipídico, à biossíntese de hormônios e à fisiopatologia das doenças neurodegenerativas (HAROLD et al., 2009). Guerreiro e colaboradores acrescentam que do ponto de vista biológico, a proteína clusterina parece ter um papel importante na patogênese da doença de Alzheimer, pois quando são comparados tecidos cerebrais de sujeitos com e sem DA, são encontrados níveis elevados de CLU nas áreas afetadas por placas amilóides. A questão do seu papel na regulação do ciclo celular é importante na patogênese da DA, pois disfunções nesse processo têm sido associadas a DA (ARENDET; BRUCKNER, 2007; YANG; HERRUP, 2007).

As funções cerebrais superiores são baseadas em uma organização dinâmica de redes neuronais. Para formar conexões sinápticas e continuamente reformulá-las, em um processo de adaptação estrutural, os neurônios devem abster-se de exercer seu ciclo celular, usando os mecanismos moleculares normalmente desenvolvidos para controle do ciclo celular e possibilitar plasticidade sináptica enquanto atribuição alternativa desta via (ARENDR; BRUCKNER, 2007). Os referidos autores comentam, ainda, que a existência desta via efetora alternativa pode colocar o neurônio sob o risco de, erroneamente, converter sinais derivados da estimulação sináptica em ativação mitogênica que, por consequência, pode ocasionar a morte celular.

Gene PICALM/CALM

A proteína PICALM (*Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein*), também conhecida como CALM (*clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia*), é codificada em seres humanos no cromossomo 11q14-21. A proteína PICALM é expressa em todos os tecidos, com maior expressão detectável nos neurônios onde se encontra distribuída nas estruturas das fendas sinápticas (YAO et al., 2005).

Os cérebros de pacientes com DA mostram uma redução do número de sinapses, e análises bioquímicas mostram que esta redução da densidade sináptica correlaciona-se com alterações da cognição (MASLIAH et al., 2001). Uma análise mais recente indica que sinapses nos cérebros de portadores de DA podem ser disfuncionais, mesmo antes do estabelecimento do processo degenerativo (FITZJOHN et al., 2001). PICALM pode estar envolvido com estas disfunções, tendo em vista a sugestão de que sua expressão aumentada foi implicada com o aparecimento de DA de início tardio (BAIG et al., 2010). Portanto, podemos supor que mudanças nos níveis de expressão de PICALM podem resultar em perturbações na transmissão sináptica mediada por acetilcolina, aumentando, assim, o risco de DA. Alternativamente, PICALM poderia influenciar o risco da doença através do processamento da proteína precursora amilóide (APP), por meio das vias endocíticas resultando em alterações nos níveis de peptídeos β amilóide (β A) (CAREY et al., 2005).

Embora significativamente associados, permanece por ser elucidada a influência destas variações na produção da proteína PICALM e dos β A. Variações sobre o gene PICALM foram associados com DA de início tardio em estudos independentes (JUN et al., 2010; HAROLD et al., 2009; LAMBERT et al., 2009). Esses estudos encontraram um efeito de proteção do alelo A do SNP rs3851179 (A/G). Os portadores desse alelo apresentaram um risco ligeiramente diminuído para a doença de Alzheimer, verificado com posterior estudo de replicação de associação em população de origem europeia (CARRASQUILLO et al., 2010), mas não em população Chinesa (YU et al., 2010).

Gene CR1/CD35

O gene do receptor do complemento 1 (CR1/CD35) está localizado no cromossomo 1q32. O CR1 é uma glicoproteína transmembrana de aproximadamente 200 kDa, de cadeia única, com uma pequena cauda citoplasmática (KLICKSTEIN et al., 1987). É multifuncional, polimórfica e expressada na membrana plasmática de eritrócitos, eosinófilos, monócitos, macrófagos e linfócitos B.

O CR1 funciona como um receptor para C3b e para C4b, e como um regulador da ativação do sistema complemento, componente do sistema imunitário inato (DYKMAN et al., 1983). Essa versatilidade é o resultado de vários domínios funcionais presentes em CR1 (KRYCH et al., 1994). O fígado é a principal fonte de proteínas do sistema complemento, mas estas proteínas também são produzidas em outros tecidos e órgãos, inclusive no sistema nervoso central (SNC), onde seus elementos são sintetizados por uma variedade de células que incluem neurônios, micróglia, astrócitos, oligodendrócitos e células endoteliais (BARNUM, 1995).

Recentes estudos demonstram associação entre o risco da doença de Alzheimer e marcadores polimórficos de CR1. Em estudos de GWAS, o SNP rs3818361 (C/T) apresentou associação com DA (JUN et al., 2010; LAMBERT et al., 2009), e os portadores do alelo T apresentaram risco 15% superior para o aparecimento de DA de início tardio. Seu risco foi identificado como importante, tanto em população europeia (LAMBERT et al., 2009), como em asiática (ZHANG et al.,

2011). Tanto CR1 como CLU e PICALM foram replicados em estudos com diferentes populações e autópsias multiétnicas, podendo ser apresentados como candidatos a modulação do fenótipo da DA, independente da etnia (JUN et al., 2010).

1.6. Neuroinflamação e Interleucinas

Algumas características, fenotípicas e moleculares estão presentes na maioria das patologias conhecidas como doenças neurodegenerativas: déficit cognitivo e/ou motor, morte neuronal acentuada, agregação protéica, formação de corpos de inclusão, estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, excitotoxicidade e presença de moléculas pró-inflamatórias nos locais da lesão (HALLIWELL, 2006). Apesar dos resultados experimentais não serem conclusivos, a deposição anormal de fragmentos insolúveis de β -amilóide (β A) não parece ser responsável por todo o espectro de sintomas clínicos da doença, principalmente aqueles observados antes da neurodegeneração tornar-se evidente. Embora o peptídeo β A desempenhe papel fundamental na fisiopatologia da DA, ainda não está suficientemente comprovado que os depósitos de placas de β A e de emaranhados neurofibrilares sejam agentes etiológicos únicos para a doença (CANDELARIO-JALIL, 2003; COMBS et al., 2001). A formação de neurofibrilas parece estar mais diretamente relacionada ao declínio da habilidade cognitiva, mas sua ocorrência aparentemente se dá muito tardiamente à acumulação de β A. Por outro lado, evidências experimentais apontam que protofibrilas e oligômeros β A1-40 e β A1-42 contribuiriam mais do que as placas de β A para causar dano tecidual e, conseqüentemente, disfunção neuronal (WALSH et al., 2002).

Na última década, além dos aspectos comportamentais típicos da instalação da DA, surgiram evidências da ocorrência de um complexo processo inflamatório no tecido neuronal. A relevância da neuroinflamação na instalação, progressão e gravidade da DA, assim como dos mecanismos de ativação do sistema imunológico e de células-chave ao disparo da cascata inflamatória no SNC, como a micróglia e astrócitos, têm sido demonstrada na literatura em várias pesquisas (GIUNTA et al., 2008; HENEKA; O'BANION, 2007; AKIYAMA et al., 2000).

A inflamação é o resultado de um conjunto de reações complexas em tecidos vascularizados, em resposta à ação de agentes nocivos responsáveis por dano tecidual, manifestando-se por migração celular, ativação de leucócitos e reações sistêmicas diversas (DOOLEY; LAMB, 2000). Células do sistema neuronal podem produzir substâncias nocivas à integridade tecidual em condições adversas, tais como citocinas pró-inflamatórias e prostaglandinas. Citocinas são componentes críticos do processo inflamatório implicadas na morte de oligodendrócitos, degeneração axonal, disfunção neuronal e na patogênese da neuroinflamação (ASCHNER et al., 2007).

Alterações inflamatórias são observadas no cérebro, principalmente nas regiões com depósito amilóide, que são ricas em células microgliais ativadas. Estas células fagocíticas constituem cerca de 10% de todas as células do sistema nervoso e representam a primeira linha de defesa contra patógenos invasores, servindo também de sensores especiais para a ocorrência de dano tecidual no cérebro (HENEKA; O'BANION, 2007; CONDE; STREIT, 2006; TAN et al., 1999; GRIFFIN et al., 1998). Em uma situação patogênica, como neurodegeneração, acidente vascular encefálico (AVE), tumores ou lesões por traumas, estas células são ativadas, migram e fagocitam células mortas ou danificadas, promovendo a eliminação destes fragmentos celulares da área afetada, de modo semelhante ao que ocorre nos macrófagos do sistema imunológico periférico (FETLER; AMIGORENA, 2005).

Além destes efeitos tóxicos, o β A pode promover a neurodegeneração por mecanismos paralelos, incluindo a ativação de células microgliais e de astrócitos. Uma vez ativada, a micróglia libera uma série de mediadores pró-inflamatórios, incluindo citocinas, fatores complemento, várias espécies de radicais livres, produtos secretórios tóxicos e óxido nítrico (NO), todos capazes de contribuir para a disfunção e morte neuronal (HENEKA; O'BANION, 2007; AKIYAMA et al., 2000; TAN et al., 1999). Fragmentos de β A estimulam a via dependente do fator nuclear kappa B (NF κ B), que é necessário para a transcrição de genes de citocinas, ativação da micróglia e de astrócitos reativos. Os aminoácidos terminais do peptídeo β A acumulado nas placas senis podem induzir astrocitose e, assim, a morte neuronal via ativação da via de proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (HENEKA; O'BANION, 2007). Tanto a ativação da micróglia como o recrutamento de astrócitos, pode ocorrer nos primeiros estágios de desregulação fisiológica e instalação da DA, antecipando mesmo a deposição de β A.

O caráter multifatorial da resposta inflamatória é caracterizado pela ocorrência de uma grande diversidade de mediadores pró e anti-inflamatórios, sendo muitos destes responsáveis pela promoção de mecanismos neurodegenerativos, enquanto outros podem limitar o avanço da inflamação ou exercer efeitos neurotróficos benéficos. Portanto, não será um único mediador, mas um conjunto de agentes inflamatórios que determinarão a prevalência de efeitos deletérios ou benéficos (GIUNTA et al., 2008; AKIYAMA et al., 2000). Nos astrócitos, a IL1 induz a produção de IL6, fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) e estimula a atividade de NO sintase induzida (iNOS); além disso, a IL1 aumenta a atividade de acetilcolinesterase (AChE) neuronal, a ativação microglial e a produção adicional de IL1, com incremento da ativação de astrócitos e expressão da citocina S100 β , levando à auto-propagação do ciclo inflamatório (MRAK; GRIFFIN, 2001; GRIFFIN et al., 1998; ROSSI; BIANCHINI, 1996). A IL6 promove astrogliose, ativação de micróglia e estimula a produção de proteínas de fase aguda, além de poder estar envolvida em processos de memória, o que foi sugerido a partir de experimentos com camundongos *knockout* submetidos a ensaios de memória e aprendizado (BRAIDA et al., 2004). Já o TNF- α , apresenta tanto efeitos pró-apoptóticos como antiapoptóticos a depender do *milieu* de coexpressão, sendo responsável pela maioria das atividades neurotóxicas secretadas pela micróglia e monócitos (COMBS, et al., 2001).

Dentre os principais mediadores inflamatórios relacionados à DA, o sistema complemento parece ser essencial à redução de acúmulos ou à remoção de placas senis induzidas por β A em camundongos. Estudos em modelos de DA com ratos transgênicos, indicam que a ausência do componente C1q do sistema complemento leva à redução da doença, com menor ativação da micróglia e aumento da integridade neuronal. Estes dados sugerem que, em estágios da DA nos quais placas fibrilares estão presentes, C1q exerce um efeito deletério à integridade neuronal, provavelmente pela ativação da via clássica da cascata complemento e do aumento da inflamação (GIUNTA et al., 2008; AKIYAMA et al., 2000).

A produção de quimiocinas no cérebro com DA está relacionada à sua função regulatória na migração microglial e no recrutamento de astrócitos para a área inflamada e, portanto, na extensão da inflamação local (GIUNTA et al., 2008; SMITS et al., 2002; AKIYAMA et al., 2000). Muitas quimiocinas e receptores de quimiocinas têm sido observados em maior expressão em cérebros com DA e parecem ter papel

importante no recrutamento de micróglia e astróglia aos sítios de deposição de β A. Estudos *in vitro* evidenciaram que monócitos humanos estimulados por β A foram capazes de gerar interleucina-8 (IL8), proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), proteína inflamatória de macrófagos tipo 1 α (MIP-1 α) e proteína inflamatória de macrófagos tipo 1 β (MIP-1 β) (SMITS et al., 2002) e que culturas de micróglia de pacientes com DA e sadios também foram capazes de aumentar a expressão de IL8, MCP-1, MIP-1 α , após exposição ao β A (LUE et al., 2001).

A ativação da micróglia também pode levar ao recrutamento de astrócitos, que aumentam a resposta inflamatória aos depósitos de β A extracelulares. Este componente neuroinflamatório da DA é adicionalmente caracterizado por uma fase de resposta aguda local mediada por citocinas, ativação da cascata complemento e indução de um sistema enzimático inflamatório, como iNOS e a ativação de cicloxigenase-2 (COX-2) (JANN; SHIRLEY; SMALL, 2002; AKIYAMA et al., 2000).

Estudos *in vitro* demonstram que o mecanismo de regulação da COX-2 difere dos sistemas celulares periféricos e no SNC, uma vez que nos primeiros ela pode ser expressa em resposta às IL1 e IL6, o que não ocorre no SNC (AKIYAMA et al., 2000). Culturas de micróglia ativadas por lipopolissacarídeo (LPS) e células astrogliais estimuladas por IL1- β foram capazes de produzir COX-2. Outros estudos, utilizando culturas de células microgliais de camundongos, revelaram que o produto enzimático principal da COX-2 consiste na prostaglandina E2 (PGE2), que pode, por sua vez, induzir a produção de COX-2 na micróglia, podendo explicar a amplificação de COX-2 nestas e em outras células (HENEKA; O'BANION, 2007). Interessante notar que a COX-1 é proeminentemente expressa na micróglia de cérebros humanos sadios, parecendo estar pouco elevada em cérebros com DA (SASTRE; WALTER; GENTLEMAN, 2008). Apesar da contribuição desta isoforma à inflamação na DA não estar comprovada, há vários relatos na literatura de sua relação com a produção de PGE2 em vários modelos experimentais de lesão aguda cerebral (HENEKA; O'BANION, 2007; CANDELARIO-JALIL et al., 2003).

Estudos epidemiológicos indicam que o uso continuado de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) foi capaz de reduzir o risco de desenvolvimento da DA (HOOZEMANS et al., 2003). Um possível modo de ação desta classe de fármacos seria a inibição seletiva da COX-2, isoforma induzida expressa de modo elevado no cérebro de pacientes portadores da DA (TUPPO; ARIAS, 2005), o que é reforçado por alguns estudos que demonstram que o RNA mensageiro (RNAm) da COX-2 está

presente em níveis elevados em áreas cerebrais afetadas pela DA (HOL et al., 1999). Em várias partes do mundo, estudos clínicos têm sido conduzidos para avaliar o efeito de alguns AINEs como tratamento auxiliar da DA, mas os resultados continuam controversos.

1.7 Polimorfismos de citocinas e doença de Alzheimer

A literatura apresenta evidências de que variações alélicas em genes inflamatórios importantes podem contribuir para determinar níveis diferenciais dos respectivos mediadores, tanto em circulação sistêmica quanto em microambientes (como SNC), o que enseja uma investigação acerca do papel de variantes alélicas clássicas para o desenvolvimento da DA (COMBARROS et al., 2009).

Polimorfismos localizados nas regiões promotoras dos genes da IL1- α e IL8 têm sido amplamente estudados como fatores de risco para a DA. Por exemplo, o polimorfismo -889 C>T da IL1- α foi associado com a DA em amostras de dois centros distintos: Indianápolis nos EUA e Munique na Alemanha (DU et al., 2000). No entanto, outros estudos realizados em diferentes populações não mostraram esta associação (DURSUN et al., 2009; HU et al., 2009; ZHOU et al., 2006; TANG et al., 2004; KUO et al., 2003). Além disso, Infante e colaboradores (2004) relataram que, nem a presença do alelo -889T da IL-1 α , nem a presença do genótipo TT do polimorfismo -251T>A da IL8 estava associado com DA em caucasianos provenientes de uma população do norte da Espanha. No entanto, indivíduos portadores do alelo T da IL1- α e do genótipo TT da IL8 apresentaram duas vezes mais risco de desenvolverem DA em comparação com outros indivíduos sem esses genótipos.

Du e colaboradores (2000), Grimaldi e colaboradores (2000) e Nicoll e colaboradores (2000) observaram que os polimorfismos da IL1- α aumentavam o risco para DA em norte-americanos, italianos e escoceses, especialmente o polimorfismo -889C>T da região promotora. Murphy e colaboradores (2001) observaram em uma amostra dos EUA que os indivíduos homocigotos para o alelo -889C tiveram um declínio significativamente mais rápido nos resultados do Mini Exame do Estado Mental (MEEM) do que os demais indivíduos, uma influência que

foi independente da presença do alelo $\epsilon 4$ da ApoE. Esses resultados contribuíram com a hipótese de McGeer e McGeer (2001), que sugeriram que a suscetibilidade à DA está fortemente associada a polimorfismos em genes relacionados a agentes inflamatórios, tais como IL1- α , IL1- β , IL6 e TNF- α .

Por outro lado, em pacientes alemães com DA, Kolsch e colaboradores (2001) observaram que homozigotos para o alelo -889T do gene promotor da IL1- α tinham uma antecipação de dez anos no desenvolvimento da DA quando comparados a portadores dos genótipos CT ou CC. Entretanto, nesse estudo foi observado que o alelo -889T, por si só, não aumentava o risco de desenvolvimento da DA, isto é, não poderia ser considerado um fator de risco individual, apesar de ser um alelo modificador dessa doença (alterando seu modo de evolução). Ainda assim, outros autores (KI et al., 2002; MATTILA et al., 2002) não observaram associação entre os polimorfismos C-889T do gene IL1- α e C-511T da região promotora do gene IL1- β e DA em populações da Coreia, Reino Unido e Finlândia.

Em linha com as evidências apresentadas para IL1, outras duas citocinas multifuncionais, IL6 e IL10, podem ser relevantes para o processo inflamatório. No SNC, a IL6 comporta-se como potente fator pró-inflamatório (GRUOL; NELSON, 1997), pois induz as proteínas de fase aguda, atua como pirógeno, aumenta a permeabilidade vascular, a ativação linfocitária e a síntese de anticorpos, enquanto a IL10, conhecido agente anti-inflamatório, atua para limitar a inflamação no cérebro (STRLE et al., 2001). Ambas são produzidas por ativação da micróglia e astrócitos (STRLE et al., 2001; GRUOL; NELSON, 1997). He e colaboradores (2010) examinaram o efeito de dois polimorfismos (-174G>C e -572C>G) do gene promotor da IL6 sobre o risco de DA em 318 pacientes com a doença. Diferenças significativas nas frequências alélicas e genóticas do polimorfismo -572C>G foram observadas nos pacientes com DA e controle. O genótipo GG foi associado com a diminuição do risco de desenvolvimento para a DA.

Em recente estudo de meta-análise, Zhang e colaboradores (2011) investigaram indivíduos com DA de origem europeia, e observaram que os portadores do alelo A (AA+AG) do polimorfismo -1082G>A da IL10 apresentaram um risco 27% maior de DA quando comparados com os homozigotos GG. No entanto, o mesmo trabalho não encontrou igual risco entre os indivíduos de origem asiática.

Infante e colaboradores (2004) publicaram evidência para uma interação entre os SNPs rs1800795 (-174G>C) de IL6 e rs1800896 (-1082G>A) de IL10, no sentido

de propor que uma sinergia entre os genótipos -174-CC de IL6 e -1082-AA de IL10 confere risco cerca de cinco vezes menor para o desenvolvimento de DA em uma amostra de indivíduos caucasianos da península espanhola, independentemente dos genótipos de ApoE. Combarros e colaboradores (2009), em estudo subsequente ao de Infante e colaboradores (2004), examinaram cinco SNPs da IL6 (rs1800797, rs1800795, rs2069837, rs2069840 e rs2069845) e quatro SNPs da IL10 (rs1800896, rs1800871, rs3024498 e rs3024505), e de modo semelhante revelaram interações entre SNPs de IL6 e IL10, mais precisamente entre o genótipo AA do SNP rs2069837 de IL6 e o genótipo CC do SNP rs1800871 de IL10, e de um modo controlado para idade, gênero e presença do alelo ϵ 4 da apolipoproteína E. Portanto, em face da elevada contribuição ibérica para a formação do contingente genético brasileiro, é do nosso interesse avaliar o papel destes SNPs para o aparecimento de DA em amostra da população idosa brasileira.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- ❖ Investigar a associação entre genótipos de mediadores da resposta inflamatória e a ocorrência do quadro demencial da doença de Alzheimer em pacientes atendidos em serviços de atenção à saúde de idosos do Distrito Federal, Brasil.

2.2 Objetivos específicos

- ❖ Estudar a distribuição alélica na população idosa brasileira de genes dos mediadores inflamatórios IL1- α , IL1- β , IL6, IL8, IL10, IL12- β , IL18, TGF- β , TLR-4 e TNF- α ;
- ❖ Investigar a contribuição alelo-específica para o advento de comprometimento cognitivo compatível com a demência de Alzheimer provável, considerada a ancestralidade étnica da população estudada e a presença do alelo ϵ 4 de ApoE como co-variáveis do estudo.

3. METODOLOGIA

3.1 Amostra estudada

A população incluída no estudo consistiu em amostra de pacientes atendidos em ambulatórios de dois serviços de geriatria de Brasília-DF: Centro de Medicina do Idoso (CMI) do Hospital Universitário de Brasília (HUB) e Hospital da Universidade Católica de Brasília (HUCB).

Participaram do estudo 630 indivíduos, com idade igual ou superior a 60 anos, de ambos os gêneros, recrutados no período de agosto de 2009 a março de 2011. Todas as avaliações clínicas foram executadas por dois geriatras experientes. A avaliação clínica de cada paciente consistiu de acompanhamento por um período de tempo de, pelo menos, dois anos para confirmar ou descartar o diagnóstico de Alzheimer ou qualquer outra forma de demência. Todos os pacientes controles foram acompanhados prospectivamente e caracterizados como cognitivamente preservados, se nenhum declínio foi observado durante o acompanhamento clínico. O diagnóstico ou confirmação de provável DA foi feita de acordo com NINCDS/ADRDA e determinada pelos médicos, com base em consulta com o paciente, entrevista com um cuidador, revisão de prontuários médicos, avaliações neuropsicológicas e/ou testes bioquímicos ou de imagem, quando indicados.

Foram coletados na admissão os seguintes dados: idade (anos), circunferência abdominal (CA; cm), pressão arterial sistólica (PAS; mmHg) e diastólica (PAD; mmHg) e nível de escolaridade. Esta última variável foi avaliada em termos de ter ensino básico ou superior (≥ 4 anos); ensino fundamental incompleto ou nenhuma educação formal (<4 anos). Para os pacientes inscritos com diagnóstico prévio de DA ou ao longo das nossas análises, as características de base consistiram em dados recolhidos no ano do início da doença.

Todos os indivíduos do grupo controle foram devidamente esclarecidos e orientados sobre a natureza, objetivo e o caráter estritamente voluntário e não invasivo do estudo, mediante leitura do termo de consentimento livre e esclarecido

(Anexo 1). No caso de pacientes com doença de Alzheimer, era solicitado que o mesmo viesse acompanhado de seu representante legal, o qual, após anuência, autorizava a participação voluntária do paciente com assinatura de um termo apropriado de consentimento livre e esclarecido, dentro das disposições éticas estabelecidas universalmente para a experimentação humana em pacientes com deficiência mental e pela resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

A seguir, os indivíduos eram convidados à coleta do material biológico para extração de DNA e posterior identificação de potenciais fatores de risco associados à condição, com ênfase sobre os genótipos dos marcadores selecionados (ApoE, IL1- α , IL1- β , IL6, IL8, IL10, IL12- β , IL18, TGF- β , TLR-4 e TNF- α), bem como a ancestralidade das populações parentais que foram categorizadas em três grupos: européia, africana e ameríndia.

O projeto de pesquisa e o termo de consentimento livre e esclarecido foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília-DF em 25 de Junho de 2009 sob o número CEP-FM 016/2009. (Anexo 2).

Critérios de inclusão:

- 1 – Idade igual ou superior a 60 anos;
- 2 – Concordar em participar da pesquisa;
- 4 – Ser paciente do CMI ou do HUCB;
- 3 – Assinar o termo de consentimento livre e esclarecido. No caso de paciente com demência o termo de consentimento foi assinado pelo responsável legal.

Critérios de exclusão:

- 1 – Idade inferior a 60 anos de idade;
- 2 – Não concordar em participar da pesquisa;
- 3 – Não assinar o termo de consentimento livre e esclarecido;
- 4 – Apresentar delirium, esquizofrenia ou depressão maior;
- 5 – Estar restrito ao leito;
- 6 – Ser portador de outros tipos de demência.

3.2 Análise Genética

Seleção dos marcadores e genotipagem

Para os experimentos laboratoriais, amostras de sangue venoso periférico foram coletadas em tubos contendo EDTA e a extração de DNA foi realizada usando kit de extração padrão (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen, Brasil). Para análise genética dos dez mediadores inflamatórios importantes [IL1- α , IL1- β , IL6, IL8, IL10, IL12- β , IL18, Fator transformador de crescimento (TGF- β 1), receptores Toll-like (TLR-4) e TNF- α], um sítio polimórfico de cada um foi selecionado baseado em evidência prévia do papel funcional para a expressão do mediador (CARDELLINI et al., 2005; TAGORE et al., 1999). As características dos marcadores selecionados estão na Tabela 1. As frequências alélicas das populações parentais foram recuperadas de um banco genômico público (HAPMAP, 2005).

Tabela 1: Descrição dos marcadores inflamatórios estudados, posição cromossômica, número de referência, alelo mais frequente e frequência em Africanos (AFR), Ameríndios (AMR) e Europeus (EUR) em populações parenterais.

Gene	Posição	SNP	Alelos	Frequências			Amostra
				AFR	AMR	EUR	
IL1- α	2q14	rs1800587	G	0.540	0.750	0.748	0.704
IL1- β	2q14	rs1143627	T	0.354	0.500	0.637	0.558
IL6	7p15	rs1800795	G	1.000	0.840	0.465	0.776
IL8	4q21	rs4073	A	0.825	n.d	0.400	0.542
IL10	1q32	rs1800896	A	0.726	0.680	0.469	0.671
IL12- β	5q33	rs3212227	A	0.673	0.630	0.810	0.715
IL18	11q23	rs1946518	G	0.655	0.540	0.608	0.552
TGFB1	19q13.1	rs1800469	C	0.792	0.630	0.712	0.624
TLR-4	9q33	rs4986790	A	0.960	0.969	0.967	0.901
TNF- α	6p21.3	rs1800629	G	0.912	0.940	0.827	0.766

nd = não disponível.

Com todos os marcadores polimórficos de nucleotídeo único selecionado (SNPs), a genotipagem foi conduzida por extensão de base única, seguido por eletroforese capilar. Fragmentos de DNA de 100-200 pb e compreendendo o sítio polimórfico foram amplificados por reação padrão de polimerase em cadeia (PCR), utilizando o Kit de PCR multiplex Qiagen. As reações Multiplex foram otimizadas com *primers* agrupadas em duas séries (série 1: rs1143627, rs4073, rs3212227, rs1800469, rs1800629 / série 2: rs1800587, rs1800795, rs1800896, rs1946518, rs4986790), de acordo com o tamanho do *primer* de base única de sequenciação, e co-amplificado na Veriti™ Dx Thermal Cycler (Applied Biosystems) usando o ciclo: desnaturação em 95°C por 15 minutos, seguido por 39 ciclos de 30 seg a 94°C, 90 seg a 57°C e 60 seg a 72°C, com a etapa final de extensão a 72°C por 10 min. Depois da amplificação, os produtos foram purificados para eliminar dNTPs e *primers* não incorporados por adição de 1 U de Exo I e 1 U de CIAP para cada 3 µL de produto de PCR corrigido para obter 1X de CIAP na solução tampão de reação. Essa mistura foi incubada por 60 min a 37°C seguido de desnaturação a 75°C por 15 min.

Para minissequenciamento, cada multiplex foi genotipado por reação de extensão de base única usando SNaPshot Multiplex System kit (Applied Biosystems, USA), seguindo recomendações do fabricante. Uma segunda purificação foi realizada através da mistura de 1 U de CIAP com 5 µL da reação de extensão de base única corrigido para 1X tampão de reação CIAP, sendo esta nova mistura incubada por 1 min a 37°C, e durante 15 s a 85°C. Após completar 1 µL de cada produto purificado até 8,83 µL com Hi-Di formamida e adicionar 0,17 µL do padrão interno GS120 Liz, foi feita eletroforese capilar em analisador genético ABI Prism 3130xl (Applied Biosystems) utilizando o polímero ABI 3700 POP 7. Os dados obtidos foram analisados no software GeneMapper (Applied Biosystems). Eletroferogramas foram considerados satisfatórios quando apenas ruído leve foi observado, permitindo identificação coincidente do sítio polimórfico por dois leitores independentes por inspeção visual. As amostras com taxa de acerto inferior a 90% foram repetidas, depois de preenchidos os espaços em branco com reações unitárias (singleplex) até todo o painel de SNPs estar preenchido.

Para genotipagem do gene da apolipoproteína E (ApoE) e determinação dos alelos ε2, ε3 e ε4 para controle estatístico, um método de PCR baseado em sistema multiplex mutação refratário foi adaptado a partir Donohoe e colaboradores (1999),

seguido por eletroforese em gel de agarose 1,6%. O controle de qualidade para o polimorfismo da ApoE consistiu na repetição sistemática das reações de amplificação para todos os portadores de $\epsilon 2$ e $\epsilon 4$.

3.3 Análise Estatística

Os casos foram classificados como positivos (afetados) ou negativos (não afetados) a partir do diagnóstico clínico da doença de Alzheimer. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi realizado para verificar a distribuição normal das variáveis contínuas dentro de cada grupo. O teste *t* de Student e o teste de qui-quadrado foram realizados para comparação de dados clínicos clássicos, social e antropométrico entre os indivíduos afetados e não afetados pela DA. O risco relativo (RR) bruto foi calculado e estratificado pela presença de qualquer alelo $\epsilon 4$ em comparação com os portadores dos demais genótipos, ajustado pelo nível médio da ascendência genética europeia, ameríndia e africana na amostra. Esta última análise foi confirmada com o teste do qui-quadrado. Ancestralidade genética individual foi estimada com um algoritmo baseado na estimativa de máxima verossimilhança (TSAI et al., 2005) e determinada exatamente como descrita por Benedet e colaboradores (2012). O valor de *p* foi considerado significativo seguindo a correção de Bonferroni para os múltiplos ($n = 10$) testes genotípicos realizados ($\alpha=0,005$). Já as análises sobre um único gene nas estratificações realizadas por ancestralidade foram consideradas significativas ao nível de 5% de confiança. Os softwares SPSS, versão 19 (SPSS Inc., Chicago, EUA), e Epi-Info, versão 3.5.1 (Centers for Disease Control, Atlanta, EUA) foram utilizados para os cálculos estatísticos.

4. RESULTADOS

De 2009 a 2011, dados de 630 pacientes (entre 60 e 96 anos) foram reunidos de acordo com os critérios de inclusão. Dos participantes, 120 foram diagnosticados com DA enquanto 412 foram identificados como indivíduos cognitivamente saudáveis. Os 98 restantes exibiram outros distúrbios cognitivos não compatíveis com DA, incluindo casos de demência mista, e foram descartados. Para avaliar a homogeneidade entre os 532 elegíveis para análise, dados biológicos, sociais e clínicos considerados clássicos na avaliação inicial foram comparados entre indivíduos afetados e não afetados por DA (Tabela 2). Nível de alfabetização, circunferência da cintura, idade e pressão arterial sistólica foram consideradas equivalentes em ambos os grupos. No entanto, diferenças em gênero e pressão arterial foram significativas, com o grupo controle apresentando maior nível de pressão arterial diastólica. Como esperado, portadores de ApoE ϵ 4 foram significativamente mais frequentes em pacientes com DA (47,5%) do que em indivíduos cognitivamente normais (19,7%).

Tabela 2: Comparação de variáveis contínuas (média e desvio padrão (SD)) e as variáveis categóricas (número absoluto (n) e proporção (%)) entre pacientes com DA e controle, não-dementes, na linha de base.

Variável	DA (n= 120)		Controle (n= 412)		<i>p</i> *
	Média	SD	Média	SD	
Idade (anos)	72,3	7,8	70,8	8,2	0,38
CA (cm)	93,5	10,4	92,1	10,0	0,53
PAS (mmHg)	134,1	20,3	137,5	22,0	0,80
PAD (mmHg)	79,3	10,6	82,1	13,1	< ,01
MEEM (pontos)	13,7	7,1	24,5	3,3	< ,001

	DA		Controle		<i>p</i> ⁺
	n	%	n	%	
Masculino	41	34,2	48	11,6	< ,001
Portadores de e4	57	47,5	81	19,7	< ,001
Escolaridade <4 anos	73	60,8	231	56,1	0,68
CDR \leq 2	52	43,3	-	-	-

DA = Doença de Alzheimer. * Significância verificada por teste *t* de Student. ⁺ Significância verificada por teste de qui-quadrado.

Em uma análise de todo o grupo, nossos resultados mostram um grau notável de estruturação da população em face ao espectro divergente de frequências dos SNPs inflamatórios, em nossa amostra, quando comparados com os das populações parentais (Tabela 1). A análise frequencial não indicou diferença significativa na distribuição alélica de oito dos dez polimorfismos imunológicos estudados quando comparamos pacientes portadores de DA com o grupo controle não demente, independentemente de um modelo dominante ou recessivo de análise (Tabela 3).

Apenas os portadores dos alelos minoritários de IL10 (-1082G) e de gene da IL6 (-174C), em modelos recessivo e dominante, respectivamente, exibiram uma associação com doença de Alzheimer. Quando aplicada a correção de Bonferroni, apenas a variação frequencial do SNP de IL10 entre portadores e não-portadores de DA preservou significância estatística, com chance quase 40% menor para a doença entre homocigotos A em comparação com portadores de todos os outros genótipos como referência (RR = 0,61; p = 0,004).

Quando dicotomizado, em termos de portadores ou não de $\epsilon 4$ para os níveis médios de herança genética, a proteção contra DA conferida pelo alelo -1084A manteve-se estatisticamente importante em 6 dos 8 cenários concebidos de acordo com um modelo recessivo, inclusive atingindo significância em modelo de dominância entre aqueles com menor proporção de ascendência européia (Tabela 4). Por outro lado, todos os outros SNPs investigados permaneceram não exibindo significativa associação com o fenótipo mesmo após esta etapa corretional.

Tabela 3: Análise de frequência dos genótipos investigados de pacientes com DA e controle, sujeitos não dementes.

Gene	Genótipos	n	Condição			RR (95% CI) [χ^2 ; P]	Genótipos	n	Condição		
			DA (%)	Controle (%)					DA (%)	Controle (%)	RR (95% CI) [χ^2 ; P]
IL-1 α	GG	273	53,3	50,7	1,08 (0,79-1,49) [0,25; 0,678]	G_	486	90,8	91,5	0,94 (0,54-1,61) [0,05; 0,853]	
	A_	259	46,7	49,2		AA	46	9,2	8,5		
IL-1 β	TT	162	28,3	31,1	0,90 (0,64-1,28) [0,33; 0,652]	T_	428	78,3	81,1	0,88 (0,60-1,28) [0,44; 0,293]	
	C_	370	71,7	68,9		CC	104	21,7	18,9		
IL-6	GG	331	59,2	63,1	0,88 (0,64-1,21) [0,61; 0,455]	G_	505	90,8	96,1	0,53 (0,33-0,86) [5,38; 0,031]	
	C_	201	40,8	36,9		CC	27	9,2	3,9		
IL-8	AA	154	31,7	28,2	1,14 (0,81-1,59) [0,56; 0,492]	A_	432	82,5	80,8	1,09 (0,72-1,66) [0,17; 0,791]	
	T_	378	68,3	71,8		TT	100	17,5	19,2		
IL-10	AA	225	30,8	45,6	0,61 (0,43-0,86) [8,34; 0,004]	A_	482	87,5	91,5	0,73 (0,46-1,15) [1,75; 0,212]	
	G_	307	69,2	54,4		GG	50	12,5	8,5		
IL-12 β	AA	279	54,2	51,9	1,07 (0,78-1,47) [0,18; 0,679]	A_	482	90,8	90,5	1,03 (0,59-1,78) [0,01; 1,000]	
	C_	253	45,8	48,1		CC	50	9,2	9,5		
IL-18	GG	160	32,5	29,4	1,16 (0,80-1,56) [0,43; 0,500]	G_	429	81,7	80,3	1,07 (0,71-1,61) [0,10; 0,794]	
	T_	372	67,5	70,6		TT	103	18,3	19,7		
TGF- β	CC	207	40,0	38,6	1,05 (0,76-1,44) [0,08; 0,831]	C_	464	84,2	88,1	0,78 (0,51-1,18) [1,29; 0,277]	
	T_	325	60,0	61,4		TT	68	15,8	11,9		
TLR-4	AA	434	83,3	81,1	1,13 (0,74-1,73) [0,32; 0,688]	A_	525	100	98,3	- [2,07; 0,358]	
	G_	98	16,6	18,9		GG	7	0	1,7		
TNF- α	GG	313	60,0	58,5	1,05 (0,76-1,45) [0,08; 0,833]	G_	494	94,2	92,5	1,24 (0,62-2,47) [0,40; 0,687]	
	A_	219	40,0	41,5		AA	38	5,8	7,5		

Valores expressos como frequências (%) de grupos diagnosticados. RR = risco relativo. CI = intervalo de confiança.

Tabela 4: Comparação da frequência dos genótipos de IL6 e IL10 dos pacientes com DA e controle, sujeitos não dementes, em subconjuntos de acordo com o genótipo de Apo E e grau de ancestralidade genética a partir de populações parentais.

Variáveis	Grupos	n	IL-6		IL-10	
			GG vs. C_	G_ vs. CC	AA vs. G_	A_ vs. GG
Apolipoproteína E	portadores de $\epsilon 4$	138	0,28; 0,721	1,55; 0,318	4,95; 0,036	1,61; 0,256
	não portadores	394	2,15; 0,157	2,38; 0,166	4,40; 0,038	0,35; 0,632
Ancestralidade europeia (%)	EUR < 59	257	0,06; 0,859	0,24; 0,448	6,44; 0,011	7,05; 0,014
	EUR \geq 59	275	0,57; 0,499	4,24; 0,061	2,46; 0,135	0,17; 0,826
Ancestralidade africana (%)	AFR < 30	258	0,43; 0,522	1,85; 0,185	0,46; 0,529	0,24; 0,577
	AFR \geq 30	274	0,20; 0,670	4,10; 0,080	10,84; 0,001	1,49; 0,258
Ancestralidade ameríndia (%)	AMR < 6	265	1,85; 0,192	3,29; 0,092	5,32; 0,024	0,27; 0,697
	AMR \geq 6	267	3,64; 0,062	0,75; 1,000	6,45; 0,026	2,46; 0,167

Dados expressos em valores de Qui-quadrado e P.

5. DISCUSSÃO

Os pacientes com DA exibem um fenótipo pró-inflamatório caracterizado por superprodução local de citocinas nas placas amilóides, bem como por uma elevação de citocinas no fluido cerebrospinal (SCHWAB, C.; MCGEER, 2008; BALES et al., 2000). Neste ambiente, as células microgлияis são responsáveis pela maior parte dos mediadores produzidos, e é possível que a sua capacidade de resposta às reações de depósitos de β -amilóide (β A) sejam proporcionais às propriedades transcricionais e/ou traducionais de genes imunológicos. Portanto, analisamos neste estudo polimorfismos em dez genes inflamatórios que podem aumentar o risco da doença de Alzheimer.

O presente estudo mostrou diferença significativa na distribuição genotípica do SNP -1082 de IL10 (rs1800896) entre pacientes com DA e indivíduos não comprometidos cognitivamente. Análises de acordo com as convenções de Cohen (1992) confirmaram diferenças que poderiam ser classificadas como um tamanho de efeito (*effect size* - ES) de elevada magnitude para os alelos de IL10 entre os indivíduos com ou sem demência (AA vs G₋, ES = 1,2), enquanto uma magnitude bastante baixa de ES foi encontrada para IL6 (G₋ vs CC, ES = 0,4). Além disso, o SNP de IL10 quase se desviou do equilíbrio de Hardy-Weinberg (P=0,054) quando todo o grupo foi considerado. No entanto, as distribuições dos genótipos para todos os genes investigados (incluindo IL10) estavam dentro do equilíbrio de Hardy-Weinberg em cada subconjunto de pacientes DA e controle. Estas podem ser evidências de uma associação importante entre o locus de IL10 e DA.

Fisiologicamente, nosso achado está de acordo com os resultados de outros grupos que atribuem um *status* de "alto produtor" de IL10 circulante para o alelo -1082A (LIU et al., 2011; WANG et al., 2001), contribuindo para a justificativa de que a supressão ou atenuação da neuroinflamação em indivíduos sensíveis podem proteger contra o aparecimento de doença de Alzheimer. O SNP -1082 de IL10 está em completo desequilíbrio de ligação com variações em outras posições que a literatura também aponta como potencialmente funcionais, a exemplo dos SNPs -819 T>C (rs1800871) e -592 C>A (rs1800872), produzindo haplótipos promotores já

implicados no risco para DA (BAGNOLI et al., 2007; SCASSELLATI et al., 2004), além de outros que merecem investigação adequada por abordagens genômicas.

Para além do papel bem caracterizado do gene ApoE na etiologia da doença de Alzheimer, evidências recentes apontam uma herança genética ampla como fator de risco adicional entre a população brasileira altamente miscigenada (BENEDET et al., 2012; SCHLESINGER et al., 2011). No entanto, nossas análises estratificadas não detectaram uma interação entre ambos os alelos $\epsilon 4$ da ApoE ou o grau de ancestralidade ameríndia e os genótipos de IL10, tornando os alelos da apolipoproteína E e a herança nativa americana como possíveis fatores de confusão, e não como variáveis modificadoras do efeito dos alelos. Ainda em relação à etnia, é de se salientar que os portadores do alelo -1082A apresentaram proteção contra DA apenas entre aqueles com maior conteúdo africano ou menor conteúdo europeu. Isto sugere que as arquiteturas alélicas inerentes a estas populações parentais podem interagir com o gene da IL10 e influenciar o fenótipo da DA, o que talvez, em parte, explique um número de estudos que não replicam este achado entre indivíduos brancos europeus (DEPBOYLU et al., 2003; RAMOS et al., 2006), salvo em contexto de interação com variações em outros elementos gênicos como IL6 (COMBARROS et al., 2009; INFANTE et al., 2004).

É possível que a convenção de Bonferroni proporcione correção excessiva para a taxa inflacionada de falsos-positivos, podendo, assim, descartar informações válidas. Análises semelhantes com indivíduos dicotomizados para ApoE e ancestralidade foram repetidos para os genótipos de IL6, mas nenhuma associação significativa foi encontrada após estas correções. Portanto, uma associação entre a ocorrência de DA e genótipos da IL6 deve ser considerada como inexistente neste momento, podendo ser sujeita a novas investigações em diferentes cenários. Usando o G*Power 3 software (FAUL et al., 2007), foi estabelecido que para uma amostra de 120 casos de DA e 412 indivíduos controles, um nível de significância de $\alpha = 0,005$, e um tamanho de efeito entre 0,4 e 1,2, o poder do teste excedeu 80% para todas as variáveis investigadas.

Nas nossas condições, a diferença na proporção dos sexos entre os indivíduos afetados e não afetados provavelmente se relacione com a longevidade e aspectos culturais, uma vez que as mulheres idosas tendem a frequentar mais serviços ambulatoriais, e os homens idosos usam mais cuidados hospitalares (BARRETO; KALACHE; GIATTI, 2006). Os reduzidos níveis de pressão arterial

diastólica podem ser atribuídos à disautonomia, que é frequente em pacientes com DA. Apesar dessas discrepâncias, ambos os aspectos podem ser considerados de menor importância para se distinguir clinicamente indivíduos de acordo com o fenótipo principal em estudo (DA). Em relação ao perfil social, as altas proporções de indivíduos com menos de quatro anos de educação formal entre os indivíduos dementes e não dementes é consistente com o nível de alfabetização, geralmente baixa nos idosos brasileiros. Este estudo é uma contribuição à literatura científica ao considerar e controlar interferências por características sociodemográficas e biológicas. Reconhecemos limitações importantes devido à heterogeneidade produzida por diferenças em uma farmacoterapia imunomodulatória (passada ou presente), e pelo método de amostragem não baseado no padrão de evolução clínica e gravidade, entre outros fatores que não foram controlados e que podem acrescentar complexidade ao cenário descrito.

Outro viés semelhante, a todos os estudos associativos consiste no fato de que uma associação não necessariamente implica causalidade. Recordamos que os SNPs aqui estudados foram selecionados com base em evidências anteriores para propriedades funcionais, mas os nossos resultados devem ser interpretados com cautela, pois o nexo de causalidade genética atual pode invocar elemento(s) adjacente(s) e/ou distante(s) do SNP indicado.

Nossos resultados sugerem que o locus IL10 afeta o desenvolvimento da doença de Alzheimer de início tardio, em um contexto que pode ser sensível à herança genética geral de idosos brasileiros. Mapeamento por desequilíbrio de ligação, por exemplo, pode ser importante para refinar a busca de elementos na arquitetura genética da população continental que possam conferir proteção ou predispor à doença de Alzheimer.

6. CONSIDERAÇÕES

Em conclusão, nosso trabalho aponta:

- para uma associação do SNP -1082 G>A de IL10 com a ocorrência da demência de Alzheimer, com uma chance quase 40% menor para a doença entre homozigotos A em comparação com portadores de todos os outros genótipos;
- que nenhuma outra variação alélica entre os demais genes inflamatórios estudados mostrou associação significativa com o desenvolvimento da demência de Alzheimer, segundo o modelo de análise empregado para o estudo;
- que a associação do SNP -1082 G>A de IL10 com a ocorrência da demência de Alzheimer se mostrou sensível ao nível de ancestralidade genética apresentada pelos indivíduos da amostra, com a proteção conferida pelo alelo A preservada apenas entre aqueles com maior conteúdo africano e menor conteúdo europeu;
- que a associação do SNP -1082 G>A de IL10 com a ocorrência da demência de Alzheimer não sofreu influência pela presença do alelo ϵ 4 de Apolipoproteína E ou pelo conteúdo de ancestralidade ameríndia da amostra.

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, R. et al. A genome-wide association study for late-onset Alzheimer's disease using DNA pooling. **BMC Medical Genetics**, v.1, p.44, 2008.

AKIYAMA, H. et al. Inflammation and Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, v.21, p.383-421, 2000.

ALMEIDA, M. A. et al. Epilepsia e demência em uma amostra de pacientes idosos acompanhados em serviço terciário. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, v.15, p.61-64, 2009.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders**. 4th ed. Washington: APA, 1994.

ARENDR, T.; BRUCKNER, M. K. Linking cell-cycle dysfunction in Alzheimer's disease to a failure of synaptic plasticity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1772, n.4, p.413-421, 2007.

ASCHNER, M. et al. Involvement of glutamate and reactive oxygen species in methyl mercury neurotoxicity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.40, p.285-291, 2007.

Grimaldi L. M. et al. Association of early-onset Alzheimer's disease with an interleukin-1alpha gene polymorphism. **Annals of Neurology**, v.47, p.361-365, 2000.

AVRAMOPOULOS, D. Genetics of Alzheimer's disease: recent advances. **Genome Medicine**, v.1, n.3, p.34, 2009.

BAGNOLI, S. et al. Association of IL10 promoter polymorphism in Italian Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v.418, n.3, p.262-265, 2007.

BAIG, S. et al. Distribution and expression of picalm in Alzheimer disease. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v.69, p.1071-1077, 2010.

BALES, K. R. et al. Neuroinflammation and Alzheimer's disease: critical roles for cytokine/Abeta-induced glial activation, NF-kappaB, and apolipoprotein E. **Neurobiology of Aging**, v.21, n.3, p.427-432; discussion 451-423, 2000.

BARNUM, S. R. Complement biosynthesis in the central nervous system. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v.6, p.132-146, 1995.

BARRETO, S. M.; KALACHE, A., GIATTI, L. Does health status explain gender dissimilarity in healthcare use among older adults? **Cadernos de Saúde Pública**, v.22, n.2, p.347-355, 2006.

BEECHAM, G. W. et al. Genome-wide association study implicates a chromosome 12 risk locus for late-onset Alzheimer disease. **The American Journal of Human Genetics**, v.84, p.35-43, 2009.

BENEDET, A. L. et al. Amerindian genetic ancestry protects against Alzheimer's disease. **Dementia and Geriatric Cognitive Disorders**, v.33, n.5, p.311-317, 2012.

BERTOLUCCI, P. H. F. et al. O Mini-Exame do Estado Mental em uma população geral: impacto da escolaridade. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v.52, p.1-7, 1994.

BERTRAM L. et al. Genome-wide association analysis reveals putative Alzheimer's disease susceptibility loci in addition to APOE. **The American Journal of Human Genetics**, v.83, p.623-632, 2008.

BRAIDA, D. et al. Cognitive function in young and adult IL (interleukin)-6 deficient mice. **Behavioural Brain Research**, v.153, n.2, p.423-439, 2004.

BROOKMEYER, R. et al. National estimates of the prevalence of Alzheimer's disease in the United States. **Alzheimers Dement**, v.7, n.1, p.61-73, 2011.

BURKE, W. J. et al. Reliability of the Washington University Clinical Dementia Rating. **Archives of Neurology**, v.45, n.1, p.31-32, 1988.

CANDELARIO-JALIL, E. et al. Assessment of the relative contribution of COX-1 and COX-2 isoforms to ischemia-induced oxidative damage and neurodegeneration following transient global cerebral ischemia. **Journal of Neurochemistry**, v.86, n.3, p.545-555, 2003.

CARDELLINI, M. et al. C-174G polymorphism in the promoter of the interleukin-6 gene is associated with insulin resistance. **Diabetes Care**, v.28, n.8, p.2007-2012, 2005.

CAREY, M. R. et al. Inhibition of dynamin-dependent endocytosis increases shedding of the amyloid precursor protein ectodomain and reduces generation of amyloid beta protein. **BMC Cell Biology**, v.6, p.30, 2005.

CARRASQUILLO, M. M. et al. Genetic variation in PCDH₁₁X is associated with susceptibility to late-onset Alzheimer's disease. **Nature Genetics**, v.41, n.2, p.192-198, 2009.

CASTELLANI, R. J. et al. Alzheimer Disease. **Dis Mon**, v.56, n.9, p.484-546, 2010.

CHANDRA, V. et al. Incidence of Alzheimer's disease in a rural community in India: the Indo-US study. **Neurology**, v.57, n.6, p.985-989, 2001.

CHAVES, M. L. et al. Incidence of mild cognitive impairment and Alzheimer disease in Southern Brazil. **Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology**, v.22, n.3, p.181-187, 2009.

CHEN, J. H.; LIN, K. P.; CHEN, Y. C. Risk factors for dementia. **Journal of the Formosan Medical Association**, v.108, n.10, p.754-764, 2009.

COHEN, J. A power primer. **Psychological Bulletin**, v.112, p.155-159, 1992.

COMBARROS, O. et al. Replication by the Epistasis Project of the interaction between the genes for IL-6 and IL-10 in the risk of Alzheimer's disease. **Journal of Neuroinflammation**, v.23, n.6, p.22, 2009.

COMBS, C. K et al. beta-Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNFalpha-dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis. **Journal of Neuroscience**, v.21, n.4, p.1179-1188, 2001.

CONDE, J. R.; STREIT, W. J. Microglia in the aging brain. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v.65, n.3, p.199-203, 2006.

COON, K. D. et al. A high-density whole-genome association study reveals that APOE is the major susceptibility gene for sporadic late-onset Alzheimer's disease. **Journal of Clinical Psychiatry**, v.68, p.613-618, 2007.

DEPBOYLU, C. et al. Lack of association of interleukin-10 promoter region polymorphisms with Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v.342, n.1-2, p.132-134, 2003.

DONOHUE, G. G. et al. Rapid identification of apolipoprotein E genotypes by multiplex amplification refractory mutation system PCR and capillary gel electrophoresis. **Clinical Chemistry**, v.45, n.1, p.143-146, 1999.

DOOLEY, M.; LAMB, H. M. Donepezil: a review of its use in Alzheimer's disease. **Drugs Aging**, v.16, n.3, p.199-226, 2000.

DRECHSEL, D. N. et al. Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by microtubule-associated protein tau. **Molecular and Cellular Biology**, v.10, n.3, p.1141-1154, 1992.

DU, Y. et al. Association of an interleukin 1-alpha polymorphism with Alzheimer's disease. **Neurology**, v.55, p.480-484, 2000.

DURSUN, E. et al. Interleukin-1alpha -889 C/T polymorphism in Turkish patients with late-onset Alzheimer's disease. **Dementia and Geriatric Cognitive Disorders**, v.27, n.1, p.82-87, 2009.

DYKMAN, T. et al. Structural heterogeneity of the C3b/C4b receptor (Cr 1) on human peripheral blood cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v.157, p.2160, 1983.

FAUL, F. et al. G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. **Behavior Research Methods**, v.39, n.2, p.175-191, 2007.

FETLER, L.; AMIGORENA, S. Neuroscience. Brain under surveillance: the microglia patrol. **Science**, v.309, n.5733, p.392-393, 2005.

FEULNER, T. M. et al. Examination of the current top candidate genes for AD in a genome-wide association study. **Molecular Psychiatry**, v.15, p.756-766, 2010.

FITZJOHN, S. M. et al. Age-related impairment of synaptic transmission but normal long-term potentiation in transgenic mice that overexpress the human APP695SWE mutant form of amyloid precursor protein. **The Journal of Neuroscience**, v.21, p.4691-4698, 2001.

FOLSTEIN, M. F. et al. 'Mini-mental state': a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. **Journal of Psychiatry**, v.12, p.189-198, 1975.

FORETTE, F. et al. Reliability of clinical criteria for the diagnosis of dementia. A longitudinal multicenter study. **Archives of Neurology**, v.46, p.646-648, 1989.

GASSEN, G. V.; ANNAERT, W. Amyloid, Presenilins and Alzheimer's disease. **Neuroscientist**, v.9, n.2, p.117-126, 2003.

GIUNTA, B. et al. Inflammaging as a prodrome to Alzheimer's disease. **Journal of Neuroinflammation**, v.5, p.51, 2008.

GOLDE, T. E. Disease modifying therapy for AD? **Journal of Neurochemistry**, v.3, n.99, p.689-707, 2006.

GREEN, E. K. et al. Are interleukin-1 gene polymorphisms risk factors or disease modifiers in AD? **Neurology**, v.58, p.1566-1568, 2002.

GRIFFIN, W. S. et al. Glial-neuronal interactions in Alzheimer's disease: The potential role of a 'cytokine cycle' in disease progression. **Brain Pathology**, v.8, p.65-72, 1998.

GRIMALDI, L. M. E. et al. Association of early-onset Alzheimer's disease with an interleukin-1- alpha gene polymorphism. **Annals of Neurology**, v.47, p.361-365, 2000.

GRUOL, D. L.; NELSON, T. E. Physiological and pathological roles of interleukin-6 in the central nervous system. **Molecular Neurobiology**, v.15, p.307-339, 1997.

GUERREIRO, R. J. et al. Genetic variability in CLU and its association with Alzheimer's disease. **PLOS ONE**, v.5, p.9510, 2010.

HAASS, C.; SELKOE, D. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.8, n.2, p.101-112, 2007.

HACHINSKI, V. C. Cerebral blood flow in dementia. **Archives of Neurology**, v.32, p.632-637, 1975.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration; where are we now? **Journal Neurochemistry**, v.97, p.1634-1658, 2006.

HANGER, D. P., ANDERTON, B. H.; NOBLE, W. Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. **Trends in Molecular Medicine**, v.15, p.112-119, 2009.

HAPMAP. A haplotype map of the human genome. **Nature**, v.437, n.7063, p.1299-1320, 2005.

HAROLD, D. et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. **Nature Genetics**, v.41, n.10, p.1088-1093, 2009.

HE, M. X. et al. Association between interleukin-6 gene promoter -572C/G polymorphism and the risk of sporadic Alzheimer's disease. **Neurological Sciences**, v.31, n.2, p.165-168, 2010.

HEINZEN, E. L. et al. Genome-wide scan of copy number variation in late-onset Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v.19, p.69-77, 2009.

HENDRIE, H. C. et al. Incidence of dementia and Alzheimer disease in 2 communities: Yoruba residing in Ibadan, Nigeria, and African Americans residing in Indianapolis, Indiana. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v.285, n.6, p.739-747, 2001.

HENEKA, M. T.; O'BANION, M. K. J. Inflammatory processes in Alzheimer's disease. **Journal of Neuroimmunology**, v.184, p.69-91, 2007.

HERNÁNDEZ, F.; AVILA, J. Tauopathies. **Cellular and Molecular Life, Sciences**, v.64, p.2219-2233, 2007

HERRERA JR., E. et al. Epidemiologic survey of dementia in a community-dwelling Brazilian population. **Alzheimer Disease and Associated Disorders**, v.16, n.2, p.103-108, 2002.

HOL, P. C. et al. Regional distribution of cyclooxygenase-2 in the hippocampal formation in Alzheimer's disease. **Journal of Neuroscience Research**, v.57, n.3, p.295-303, 1999.

HOOZEMANS, J. J. et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and cyclooxygenase in Alzheimer's disease. **Current Drug Targets**, v.4, n.6, p.461-468, 2003.

HU, J. L. Genetic analysis of interleukin-1A C(-889)T polymorphism with Alzheimer disease. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v.29, n.1, p.81-85, 2009.

HUGHES, C. P. et al. A new clinical scale for the staging of dementia. **The British Journal of Psychiatry**, v.140, p.566-572, 1982.

INFANTE, J. et al. Gene-gene interaction between interleukin-6 and interleukin- 10 reduces AD risk. **Neurology**, v.63, p.1135-1136, 2004.

IQBAL, K. et al. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1739, p.198-210, 2005.

JANN, M. W. et al. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of cholinesterase inhibitors. **Clinical Pharmacokinetics**, v.41, n.10, p.719-739, 2002.

JORM, A. F. Cross-national comparisons of the occurrence of Alzheimer's and vascular dementias. **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**, v.240, n.4-5, p.218-222, 1991.

JUN, G. et al. Meta-analysis confirms CR1, CLU, and PICALM as Alzheimer disease risk loci and reveals interactions with APOE genotypes. **Archives of Neurology**, v.67, n.12, p.1473-1484, 2010.

KI, C. S. et al. Lack of association of the interleukin-1-alpha gene polymorphism with Alzheimer's disease in a Korean population. **Annals of Neurology**, v.49, p.817, 2002.

KLICKSTEIN, L. et al. Human C3b/C4b receptor (CR1). Demonstration of long homologous repeating domains that are composed of the short consensus repeats characteristics of C3/C4 binding proteins. **The Journal of Experimental Medicine**, v.165, p.1095, 1987.

KNOPMAN, D. et al. Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study Investigators. Cardiovascular risk factors and cognitive decline in middle-aged adults. **Neurology**, v.9; v.56, n.1, p.42-48, 2001.

KÖLSCH, H. et al. Gene polymorphisms of interleukin-1-alpha influence the course of Alzheimer's disease. **Annals of Neurology**, v.49, p.818-819, 2001.

KRYCH, M. et al. Analysis of the functional domains of complement receptor type 1 (C3b/C4b receptor; CD35) by substitution mutagenesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v.269, p.13273-13278, 1994.

KUO, Y. M. et al. Lack of association between interleukin-1alpha polymorphism and Alzheimer disease or vascular dementia. **Alzheimer Disease and Associated Disorders**, v.17, n.2, p.94-97, 2003.

LAFERLA, F.; GREEN, K.; ODDO, S. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v.7, p.499-509, 2007.

LAKS, J. et al. O mini exame do estado mental em idosos de uma comunidade: dados parciais de Santo Antônio de Pádua, RJ. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v.61, n. 3B, 2003.

LAMBERT, J. C. et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. **Nature Genetics**, v.41, p.1094-1099, 2009.

LI, H. et al. Candidate single-nucleotide polymorphisms from a genomewide association study of Alzheimer disease. **Archives of Neurology**, v.65, p.45-53, 2008.

LICATELLI, J. F. et al. Influência genética sobre a doença de Alzheimer de início precoce. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v.36, n.1, p.25-30, 2009.

LIU, N. et al. An association of interleukin-10 gene polymorphisms with Graves' disease in two Chinese populations. **Endocrine**, v.40, n.1, p.90-94, 2011.

LOPES, M. A.; BOTTINO, C. M. C. Prevalência de demência em diversas regiões do mundo: análise dos estudos epidemiológicos de 1994 a 2000. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v.60, p.61-69, 2002.

LUE, L. F. et al. Inflammatory repertoire of Alzheimer's disease and nondemented elderly microglia in vitro. **Glia**, v.35, n.1, p.72-79, 2001.

MASLIAH, E. et al. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v.56, n.1, p.127-129, 2001.

MATTILA, K. M. et al. Association of an interleukin 1B gene polymorphism (-511) with Parkinson's disease in Finnish patients. **Journal of Medical Genetics**, v.39, n.6, p.400-402, 2002.

MCCULLA, M. M. et al. Reliability of clinical nurse specialists in the staging of dementia. **Archives of Neurology**, v.46, n.11, p.1210-1211, 1989.

MCGEER, P. L.; MCGEER, E. G. Polymorphisms in inflammatory genes and the risk of Alzheimer disease. **Archives of Neurology**, v.58, p.1790-1792, 2001.

MCKEE, A. C. et al. Chronic traumatic encephalopathy in athletes: progressive tauopathy following repetitive head injury. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v.68, n.7, p.709-735, 2009.

MCKHANN, G. et al. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: Report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of the Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's disease. **Neurology**, v.34, p.939-944, 1984.

MORRIS, J. C. The Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules. **Neurology**, v.43, n.11, p.2412-2414, 1993.

MRAK, R. E.; GRIFFIN, W. S. Interleukin-1, neuroinflammation, and Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, v.22, n.6, p.903-908, 2001.

MURPHY, G. M. et al. Rate of cognitive decline in AD is accelerated by the interleukin-1-alpha -889 *1 allele. **Neurology**, v.56, p.1595-1597, 2001.

MURRELL, R. et al. Association of apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease in African Americans. **Archives of Neurology**, v.63, p.431-434, 2006.

NAJ, A. C. et al. Dementia revealed: novel chromosome 6 locus for late-onset Alzheimer disease provides genetic evidence for folate-pathway abnormalities. **PLOS Genetics**, v.6, n.9, p.1001-1130, 2010.

NATIONAL HUMAN GENOME RESEARCH INSTITUTE (NHGRI). Disponível em: <http://www.genome.gov/gwastudies>). Acesso em: 08 de ago. 2012.

NICOLL, J. A. R. et al. Association of interleukin-1 gene polymorphisms with Alzheimer's disease. **Annals of Neurology**, v.47, p.365-368, 2000.

NITRINI, R. et al. Diagnóstico de doença de Alzheimer no Brasil. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v.63, p.720-727, 2005.

_____. Incidence of dementia in a communitydwelling Brazilian population. **Alzheimer Disease and Associated Disorders**, v.18, n.4, p.241-246, 2004.

_____. Prevalence of dementia in Latin America: a collaborative study of population-based cohorts. **International Psychogeriatrics**, v.21, p.622-630, 2009.

OGUNNIYI, A. et al. Epidemiology of dementia in Nigeria: results from the Indianapolis-Ibadan study. **European Journal of Neurology**, v.7, n.5, p.485-490, 2000.

PODUSLO, S. E. et al. Genome screen of late-onset Alzheimer's extended pedigrees identifies TRPC4AP by haplotype analysis. **American Journal of Medical Genetics Part. B: Neuropsychiatric Genetics**, v.150B, p.50-55, 2009.

RAMOS, E. M. et al. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 10 promoter region polymorphisms and risk of late-onset Alzheimer disease. **Archives of Neurology**, v.63, n.8, p.1165-1169, 2006.

REIMAN, E. M. et al. GAB2 alleles modify Alzheimer's risk in APOE epsilon4 carriers. **Neuron**, v.54, p.713-720, 2007.

ROCHA-GONZÁLEZ, H. I. et al. Resveratrol: a natural compound with pharmacological potential in neurodegenerative diseases. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v.14, n.3, p.234-247, 2008.

ROGAEVA, E. The solved and unsolved mysteries of the genetics of early onset Alzheimer's disease. **Neuromolecular Medicine**, v.2, n.1, p.1-10, 2002.

ROSSI, F.; BIANCHINI, E. Synergistic induction of nitric oxide by beta-amyloid and cytokines in astrocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.225, n.2, p.474-478, 1996.

SASTRE, M.; WALTER, J.; GENTLEMAN, S. M. Interactions between APP secretases and inflammatory mediators. **Journal of Neuroinflammation**, v.5, p.25, 2008.

SCASSELLATI, C. et al. Promoter haplotypes of interleukin-10 gene and sporadic Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v.356, n.2, p.119-122, 2004.

SCHLESINGER, D. et al. African ancestry protects against Alzheimer's disease-related neuropathology. **Molecular Psychiatry**, 2011.

SCHWAB, C.; MCGEER, P. L. Inflammatory aspects of Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. **Journal of Alzheimers Disease**, v.13, n.4, p.359-369, 2008.

SMITS, H. A. et al. Amyloid- β -induced chemokine production in primary human macrophages and astrocytes. **Journal of Neuroimmunology**, v.127, n.1-2, p.160-168, 2002.

STRLE, K. et al. Interleukin-10 in the brain. **Critical Reviews in Immunology**, v.21, p.427-449, 2001.

SUH, Y.; CHECLER, F. Amyloid Precursor Protein, Presenilins, and α -Synuclein. Molecular Pathogenesis and Pharmacological Applications in Alzheimer's Disease (Review). **Pharmacological Review**, v.54, p.469-525, 2002.

TAGORE, A. et al. Interleukin-10 (IL-10) genotypes in inflammatory bowel disease. **Tissue Antigens**, v.54, n.4, p.386-390, 1999.

TAN, J. et al. Microglial activation resulting from CD40-CD40L interaction after beta-amyloid stimulation. **Science**, v.286, n.5448, p.2352-2355, 1999.

TANG, M. X. et al. Analysis on association between the polymorphisms in apolipoprotein E, interleukin-1 alpha genes and Alzheimer's disease in Chengdu area. **Journal of Medical Genetics**, v.21, n.2, p.176-178, 2004.

TANG, M. X. et al. Relative risk of Alzheimer disease and age-at-onset distributions, based on APOE genotypes among elderly African Americans, Caucasians, and Hispanics in New York City. **The American Journal of Human Genetics**, v.58, n.3, p.574-584, 1996.

TSAI, H. J. et al. Comparison of three methods to estimate genetic ancestry and control for stratification in genetic association studies among admixed populations. **Human Genetics**, v.118, n.3-4, p.424-433, 2005.

TUPPO, E. E.; ARIAS, H. R. The role of inflammation in Alzheimer's disease. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.37, n.2, p.289-305, 2005.

TURNER, P. R. et al. Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. **Progress in Neurobiology**, v.70, p.1-32, 2003.

VALE, F. A. C. Diagnóstico diferencial das demências I: demências degenerativas vs. outras demências (ou demências secundárias). **Alzheimer Hoje**, São Paulo, v.5, n.2, p.13-18, 2005.

VENKETASUBRAMANIAN, N. et al. Interethnic differences in dementia epidemiology: global and Asia-Pacific perspectives. **Dementia and Geriatric Cognitive Disorders**, v.30, n.6, p.492-498, 2010.

WALSH, D. M. et al. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. **Nature**, v.416, n.6880, p.535-539, 2002.

WANG, A. H. et al. The effect of IL-10 genetic variation and interleukin 10 serum levels on Crohn's disease susceptibility in a New Zealand population. **Human Immunology**, v.72, n.5, p.431-435, 2011.

WEBSTER, J. A. et al. Sor11 as an Alzheimer's disease predisposition gene? **Neurodegenerative Diseases**, v.5, p.60-64, 2008.

WIMO, A.; WINBLAD, B. Health economical aspects of Alzheimer disease and its treatment. **Psychogeriatrics**, v.1, n.3, p.189-193, 2001.

WORLD ALZHEIMER REPORT (2011). **Alzheimer's Disease International**. Anuário 2009.

YANG, Y.; HERRUP, K. Cell division in the CNS: protective response or lethal event in post-mitotic neurons? **BBA – Biochimica et Biophysica Acta**, v.1772, p.457-466, 2007.

YAO, P.J. et al. Synaptic distribution of the endocytic accessory proteins AP180 and CALM. **Journal of Comparative Neurology**, v.481, n.1, p.58-69, 2005.

YU, G. et al. Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and betaAPP processing. **Nature**, v.407, p.48-54, 2000.

ZHANG, Y. et al. The -1082G/A polymorphism in IL-10 gene is associated with risk of Alzheimer's disease: a meta-analysis. **Journal of the Neurological Sciences**, v.303, n.1-2, p.133-138, 2011.

ZHOU, Y. T. et al. Association between interleukin-1 alpha-889 C/T polymorphism and Alzheimer's disease in Chinese Han population. **Zhogguo Yi Xue Ke Xue Yan Xue Bao**, v.28, n.2, p.186-190, 2006.

ANEXOS

Anexo 1 - Termo de consentimento livre e esclarecido

Anexo 2 - O projeto de pesquisa e o termo de consentimento livre e esclarecido foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília-DF em 25 de Junho de 2009 sob o número CEP-FM 016/2009.

Anexo 3 - Aprovação da FAPDF

Anexo 4 - Exames complementares (Admissão)

Anexo 5 - Artigo científico submetido à Neuroimmunomodulation

Anexo 6 - Produção científica durante o doutoramento.

Anexo 1 - Termo de consentimento livre e esclarecido.



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UNB
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA - HUB
CENTRO DE MEDICINA DO IDOSO - CMI



tecnologia e atenção à saúde aplicadas ao estudo dos determinantes genômicos dos transtornos demenciais

O envelhecimento pode ocasionar doenças ou o agravamento de suas manifestações no organismo, diminuindo a qualidade de vida da pessoa. Por isso, nós do Centro de Medicina do Idoso do Hospital Universitário de Brasília (HUB), em conjunto com pesquisadores da Universidade de Brasília (UnB), estamos trabalhando na busca por sinais clínicos e de laboratório que permitam prevenir o desenvolvimento de doenças associadas ao envelhecimento, sobretudo aquelas relacionadas à perda de memória e das funções mentais.

Assim sendo, com o objetivo de encontrar características do organismo que possam contribuir para o diagnóstico precoce de doenças como a demência de Alzheimer, necessitamos do seu consentimento para a realização de uma avaliação médica e de exames laboratoriais por testes genéticos. Esta pesquisa poderá possibilitar uma melhoria da compreensão do processo de envelhecimento do ser humano, o que por sua vez permitirá melhorar o atendimento e o aconselhamento prestados a pessoas idosas assistidas tanto pelos programas públicos e quanto privados de saúde.

Dependendo dos resultados e de sua avaliação, o(a) senhor(a) poderá ser incluído(a) no grupo de portadores ou não-portadores de alguma doença.

Termo de consentimento

Ao aceitar participar desta pesquisa, fui informado que poderei a qualquer momento recusar-me a continuar, retirando meu consentimento sem sofrer qualquer penalização. Fui informado que o protocolo experimental consistirá basicamente em uma avaliação médica e por exames laboratoriais, e que tais procedimentos não comprometerão minhas atividades cotidianas. Responderei algumas perguntas sobre os medicamentos que estou usando e como faço o tratamento recomendado, mas terei plena liberdade de me recusar a responder caso eu não queira. Fui informado(a) ainda que este trabalho não oferecerá riscos expressivos à minha saúde, já que não realizarei movimentos anormais, não terei mudança da minha rotina, não entrarei em contato com quaisquer substâncias nocivas, nem terei qualquer instrumento introduzido em meu corpo, a não ser por ocasião de uma coleta de sangue, onde me foi assegurada utilização de agulhas descartáveis. A equipe do projeto se responsabilizou por prestar esclarecimentos a mim a qualquer momento da pesquisa, inclusive relativos a exames de laboratório realizados, disponibilizando para tanto as formas de contato presentes no rodapé desta página.

O pesquisador garantiu sigilo sobre minha identidade pois os dados ficarão sob sua guarda, não sendo permitido acesso por pessoas não relacionadas à pesquisa, sendo ainda a melhor conduta para preservação da minha integridade física. O pesquisador responsabilizou-se por qualquer dano que eu venha a sofrer, e também explicou que as amostras coletadas poderão ser armazenadas para outras pesquisas, mas que serei contatado para conceder minha autorização para cada nova utilização.

Assim, por meio deste documento, dou meu consentimento à exploração dos dados coletados por este projeto de pesquisa, do qual participarei voluntariamente.

Brasília, _____ de _____ de 200____.

 Nome do paciente

 Assinatura do responsável ou do paciente

 Assinatura do profissional que prestou informações

Anexo 2 – Parecer de aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília-DF em 25 de Junho de 2009 sob o número CEP-FM 016/2009.



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos

ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro de Projeto: CEP-FM 016/2009.

Título: "biotecnologia e atenção à saúde aplicadas no estudo dos determinantes genômicos dos transtornos demenciais."

Pesquisador Responsável: Otávio de Toledo Nóbrega.

Documentos analisados: Folha de rosto, carta de encaminhamento, declaração de responsabilidade, protocolo de pesquisa, termo de consentimento livre e esclarecido, cronograma, bibliografia pertinente e currículo (s) de pesquisador (es).

Data de entrega: 11/03/2009.

Proposição do (a) relato (a)

Aprovação

Não aprovação.

Data da primeira análise pelo CEP-FM/UNB: 18/04/2009.

Data do parecer final do projeto pelo CEP-FM/UNB: 24/06/2009.

PARECER

Com base na Resolução CNS/MS nº 196/96 e resoluções posteriores, que regulamentam a matéria, o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília decidiu **APROVAR** "ad referendum", conforme parecer do (a) relator (a) o projeto de pesquisa acima especificado, quanto aos seus aspectos éticos.

1. Modificações no protocolo devem ser submetidas ao CEP, assim como a notificação imediata de eventos adversos graves;
2. O (s) pesquisador (es) deve (m) apresentar relatórios periódicos do andamento da pesquisa ao CEP-FM.

Brasília, 25 de Junho de 2009.


Prof. Elaine Maria de Oliveira Ayes
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
Faculdade de Medicina-UNB

Anexo 3 - Aprovação da FAPDF.



**GOVERNO DO DISTRITO FEDERAL
SECRETARIA DE ESTADO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA
FUNDAÇÃO DE APOIO À PESQUISA**



Brasília, 07 de outubro de 2008.

Ao Senhor
Otávio de Toledo Nóbrega
Título do Projeto: Biotecnologia e atenção à saúde aplicada ao estudo dos determinantes genômicos dos transtornos demenciais
Processo n.º 193.000.449/2008

Prezado Coordenador,

É com satisfação que comunicamos a Vossa Senhoria que a proposta acima apresentada a esta FAPDF, em atendimento ao Edital 05/2008 – Demanda Espontânea foi aprovada para receber o apoio na referida Chamada no montante de R\$50.000,00 (cinquenta mil reais).

Solicitamos à V.Sa. que envie urgente a FAPDF até **10/10/2008**, os documentos abaixo citados e a adequação do seu projeto no montante aprovado:

CUSTEIO (R\$)	CAPITAL (R\$)
45.800,00	4.200,00

Quadro de Usos e Fontes preenchido e assinado pelo Coordenador

O Conselho Diretor homologou a decisão do CNPq e aprovou a concessão do recurso, **sem** cortes, no valor total acima descrito. Desse modo, a assinatura do Termo de Outorga e Aceitação fica condicionada à apresentação do novo Quadro de Usos e Fontes e Quadros Anexos já efetuados os cortes abaixo descritos, se houver:

- Nenhum

1. Certidão Negativa de Débito com a Secretaria de Fazenda do Distrito Federal
2. Certidão conjunta Negativa de Débito de Tributos Federais e da dívida ativa da união
3. Cópia da Identidade, CPF e Comprovante de Residência.
4. Termo de Aceite da Instituição Executora assinado por um representante da Instituição
5. Quadro de Usos e Fontes assinado pelo Coordenador
6. Orçamento com base no valor aprovado pela FAPDF

Atenciosamente,

Renato Fontes Guimarães
Diretor Técnico-Científico

Anexo 4 – Ficha clínica (admissão).



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UNB
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA - HUB
CENTRO DE MEDICINA DO IDOSO - CMI



FICHA CLÍNICA/ANAMNESE

PCT N. _____

<p>1. NOME: _____</p> <p>Registro CMI _____</p> <p>Data da 1ª avaliação cognitiva: ____/____/____</p>	<p>DATA NASC: ____/____/____</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-top: 10px;"> <p><input type="checkbox"/> CONTROLE</p> <p><i>NÃO SE APLICAM AO GRUPO CONTROLE OS ITÊNS DIAGNÓSTICO CLÍNICO, NPI, MEEM FINAL, CDR E HACHINSKI</i></p> </div>
<p>Diagnóstico clínico: <input type="checkbox"/> DA <input type="checkbox"/> Demência vascular <input type="checkbox"/> D. Lewy <input type="checkbox"/> D. Mista <input type="checkbox"/> Outras</p> <p>NPI _____ MEEM INICIAL _____ MEEM FINAL _____</p> <p>HACHINSKI _____</p> <p>PRESSÃO ARTERIAL (POSIÇÃO DEITADA):</p> <p>PA SISTÓLICA _____ mmHg <input type="checkbox"/> HIPOTENSÃO ORTOSTÁTICA</p> <p>PA DIASTÓLICA _____ mmHg</p> <p>CDR INICIAL: <input type="checkbox"/> nenhuma <input type="checkbox"/> questionável <input type="checkbox"/> leve <input type="checkbox"/> moderada <input type="checkbox"/> grave</p> <p>CDR FINAL: <input type="checkbox"/> nenhuma <input type="checkbox"/> questionável <input type="checkbox"/> leve <input type="checkbox"/> moderada <input type="checkbox"/> grave</p> <p>Escolaridade: <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> <= 4 anos <input type="checkbox"/> 5 a 8 anos <input type="checkbox"/> > 8 anos</p> <p>Gênero: <input type="checkbox"/> Masculino <input type="checkbox"/> Feminino</p>	
<p>2. COMORBIDADES</p>	
<p><input type="checkbox"/> Hipertensão arterial <input type="checkbox"/> Hipotireoidismo <input type="checkbox"/> Diabetes mellitus</p> <p><input type="checkbox"/> AVE <input type="checkbox"/> Doença de Chagas <input type="checkbox"/> Dislipidemias</p> <p><input type="checkbox"/> Coronariopatia <input type="checkbox"/> Insuf. cardíaca <input type="checkbox"/> Outras</p>	
<p>3. HISTÓRIA SOCIAL PREGRESSA (antes dos sinais e sintomas demenciais)</p>	
<p><input type="checkbox"/> Tabagismo: Por qtos anos _____ <input type="checkbox"/> Etilismo: Por qtos anos _____</p> <p><input type="checkbox"/> Sedentário <input type="checkbox"/> Exercícios físicos regulares nos últimos 10 anos anteriores à doença</p>	

LABORATORIAIS:	
TSH:	HEMOGLOBINA:
B12:	VDRL:
HIV:	TGO:
CA ²⁺ :	TGP:
TGL:	COL.TOTAL:
HDL:	LDL:
VLDL:	GLICOSE:
CREATININA:	UREIA:
FOLATO:	

IMAGEM: (ÚLTIMOS EXAMES)
RNM=
TC=

OUTROS:
DATA: ___/___/___
_____ Médico

Anexo 5 - Artigo científico aceito pelo periódico Neuroimmunomodulation.

Cytokine gene polymorphisms and the Alzheimer disease in Brazil

Clayton F. Moraes ^{a,b}, Andrea L. Benedet ^a, Vinícius C. Souza ^c, Túlio C. Lins ^d,
Einstein F. Camargos ^{a,e}, Janeth O. S. Naves ^f, Ciro J. Brito ^g, Cláudio Córdova ^h,
Rinaldo W. Pereira ^{d,h,i}, Otávio T. Nóbrega ^{a,f,*}.

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Universidade de Brasília, Brazil; ^bHospital da Universidade Católica de Brasília, Brazil; ^cPrograma de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brazil; ^dPrograma de Pós-Graduação em Patologia Molecular, Universidade de Brasília, Brazil; ^eHospital Universitário de Brasília, Brazil; ^fPrograma de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brazil; ^gPrograma de Pós-Graduação em Educação Física, Universidade Federal de Sergipe, Brazil; ^hPrograma de Pós Graduação em Educação Física, Universidade Católica de Brasília, Brazil; ⁱPrograma de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brazil.

Category: original article

Running head: cytokine polymorphisms and Alzheimer's disease

*Corresponding author: Otávio T. Nóbrega

Address: Campus Universitário Darcy Ribeiro

Asa Norte, Brasília – DF, 70910-900

Brazil

Phone (+55 61) 3107 1916 — E-mail: nobrega@pq.cnpq.br; otavionobrega@unb.br

Abstract

We analyzed polymorphisms in ten inflammatory genes and compared the genotype distribution across outpatients with late-onset Alzheimer disease (AD) and non-cognitively impaired subjects from Midwest Brazil, controlling for ancestry heritage and Apo E genotype. Our findings show an almost 40% lower chance for AD ($p = 0.004$) among homozygotes of the IL10 -1082A allele (rs1800896). Dichotomization to ApoE and mean ancestry levels did not affect protection except among those with greater European or minor African heritage. The IL10 locus seems to affect the onset of AD in a context sensitive to the genetic ancestry of Brazilian older adults.

Key terms: Alzheimer's disease, dementia, cytokine, inflammation, markers, genetic ancestry, continental population, admixture, complex disease.

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most common progressive neurodegenerative disorder worldwide, affecting nearly 27.7 million people presently and with over 4.5 million new cases diagnosed every year, with major healthcare and socioeconomic impacts (Ferri et al., 2005). This disease is characterized by injury to the central nervous system (CNS) with memory loss along with decline in any other cognitive function (Castellani et al., 2010; Smith, 1998), and may exhibit early- or late-onset forms depending on intrinsic pathophysiological mechanisms (Gallucci Neto et al., 2005). The ultimate cause of dementia is the loss of neurons and of the synaptic connections between them. However, the insults that produce this loss remain to be determined. Immune response and resulting neuroinflammation may be important in mediating neuronal damage in AD. A typical immune response at the SNC includes activation of microglia cells and astrocytes along with increased cytokine and/or acute-phase protein expression (Tuppo and Arias, 2005). The hazardous effect of a pro-inflammatory profile in AD is supported by epidemiological evidence of a potential protective effect of anti-inflammatory responses (Heneka et al., 2011; Pasinetti, 2002). In addition, evidence suggests that the risk of AD is affected by genetic variation in inflammatory modulators, such as interleukin 1-alpha (IL1- α), IL1- β , IL-6, tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and others (Lio et al., 2006; Wan et al., 2008). Recent genome-wide association study has described an association between AD risk and polymorphic site (rs3818361) at the complement receptor 1 (CR1) gene, placing an immunological marker into the framework of AD's etiology (Lambert et al., 2009; Moraes et al., 2012). Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes encoding these molecules could affect biological activity by regulating transcription, translation, and secretion. Therefore, factors modulating the degree of inflammatory damage might influence the risk of AD.

Considered a complex phenotype, the late-onset AD's etiology is largely affected by modifiable (e.g., literacy level) and non-modifiable (e.g., genetic architecture) factors (Almkvist and Winblad, 1999; Castellani et al., 2010). Regardless of the technology employed (from single gene to genome-wide centered), most of the AD related genetic risk factors were identified by the 'association study' approach, in which the frequency of a specific genotype is compared among affected and non-affected people. Although useful, this approach has methodological biases

mostly in stratified population, when spurious associations arise from non-perceived genetic structure within an admixed population (Choudhry et al., 2006). For traits that bear evidence for differential risk among populations with distinct continental background (e.g., Europeans and Africans), estimating ancestry proportions is a strategy that can help obtaining knowledge about structure of complex traits (Drineas et al., 2010; Nassir et al., 2009; Paschou et al., 2007; Tian et al., 2008). The Brazilian contingent is highly admixed, with roughly 60 to 75% of its ancestry derived from Iberian whites, 10 to 30% from West Africans and 5 to 20% from native Americans (Lins et al., 2010; Pena et al., 2011). Studies worldwide have linked AD with ethnic differences in several populations (Hou et al., 2006; Murrell et al., 2006; Venketasubramanian et al., 2010). However, few association trials performed with Brazilian AD patients considered genetic ancestry estimates as main or accessory variables when investigating markers to this complex phenotype.

Our purpose was to investigate if genotypes of 10 important immunological mediators could be associated with the development of the late-onset form of the Alzheimer's disease in the Brazilian contingent. Ancestry informative markers were used to ascertain the structure of the sample, thus placing ancestry estimates as correction factor in our analyses.

Methods

Subjects

The present study represents an analysis of data from an ongoing initiative for cognitive assessments in Brasília, Brazil (Benedet et al., 2012), whose methods are reproduced below. This city (~ 2.6 million inhabitants) has the important feature of being planned and constructed to bring the administrative capital from the coast to the midwest of Brazil, giving rise to a migration process over the last 50 years. For that reason, the capital's elderly population (~ 200.000 inhabitants) is considered an expression of the genetic diversity of all Brazilian regions.

Subjects with or without previous diagnosis of Alzheimer's Disease were consecutively enrolled and clinically followed for a minimum time span of two years, either at the Medical Center for the Aged Outpatient at Universidade de Brasília or at

the Ambulatory for Elderly Care at Universidade Católica de Brasília. Both institutions are located at the metropolitan area of the Brazilian Federal District and employ skilled staffs for management of cognitive disorders. To participate in this research, each volunteer or responsible caregiver provided written consent approved by the Institutional Review Board. Project enrollment eligibility criteria consisted on being aged 60 years or older and to fulfill clinical assessments.

Data collection

All clinical assessments were executed by two experienced geriatricians. Clinical evaluation of each patient consisted of his/her follow up for a time span of at least two years to confirm or rule out the diagnosis of AD or any other form of dementia. All patients entitled for control subjects were followed prospectively and rendered as cognitively preserved whether no decline was observed during follow up. Demented individuals could be followed either retrospectively when enrolled with prior diagnosis of AD or by prospective means whenever newly admitted, newly diagnosed amongst the non-demented or followed at the Centers for less than two years at the onset of the study. The diagnosis or confirmation of probable AD was made according to NINCDS/ADRDA criteria and determined by the clinicians on the basis of consultation with the patient, interview with a knowledgeable informant, review of medical records, neuropsychological assessments and/or laboratory tests, whenever applicable.

At admission, all patients were assessed with a validated Brazilian Portuguese version of the Mini-Mental State Examination (MMSE), whereas the Clinical Dementia Rating (CDR) scale was obtained for demented patients only. Also at admission, data as age (years), waist circumference (WC; cm), systolic (SBP; mmHg) and diastolic (DBP; mmHg) blood pressure and literacy level were collected. This latter variable was assessed in terms of having either a complete basic cycle of educational or higher (≥ 4 years) or an incomplete basic cycle or no formal education at all (< 4 years). For patients enrolled with prior diagnosis of AD or throughout our assessments, baseline characteristics consisted of data collected at the year of onset of the disease.

Markers selection and genotyping

For laboratory experiments, peripheral venous blood samples were collected into EDTA-containing tube and DNA extraction was performed using standard extraction kits (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen, Brazil). For genetic analyses of 10 important inflammatory mediators [IL1- α , IL1- β , IL6, IL8, IL10, IL12- β , IL18, Transforming growth factor (TGF)- β 1, Toll-like receptor (TLR)-4 and TNF- α], one polymorphic site in each was selected based on prior evidence of functional role for the mediator's expression (Bergholdt et al., 2004; Bidwell et al., 1999; Bidwell et al., 2001; Cardelli et al., 2008; Cardellini et al., 2005; Giedraitis et al., 2001; Pociot et al., 1992; Pociot et al., 1994; Tagore et al., 1999). Characteristics of selected marker are shown in Table 1. Allelic frequencies from the parental populations were retrieved from a public genomic database (HapMap, 2005). From those, five (rs1800587, rs1143627, rs1800795, rs4073 and rs1800896) displayed at least a modest difference ($\delta > 0.2$) between in European and African frequencies, two between European and Native American frequencies (rs1800795 and rs1800896), and one between African and Native American frequencies (rs1800587).

Since all selected markers were single nucleotide polymorphisms (SNPs), genotyping was conducted by a single base extension procedure followed by capillary electrophoresis. Briefly, DNA fragments encompassing the polymorphic site and sized 100 to 200 pb were amplified by standard polymerase chain reaction (PCR) using the Qiagen Multiplex PCR Kit. Multiplex reactions were optimized with primers segregated into two sets (set 1: rs1143627, rs4073, rs3212227, rs1800469, rs1800629 / set 2: rs1800587, rs1800795, rs1800896, rs1946518, rs4986790), according to the size of the single-base sequencing primer, and co-amplified in a Veriti™ Dx Thermal Cycler (Applied Biosystems) using the following cycles: denaturation at 95°C for 15 min, followed by 39 cycles of 30 s at 94°C, 90 s at 57°C and 60 s at 72°C, with a final extension step at 72°C for 10 min. Following amplification, products were purified to eliminate non-incorporated dNTPs and primers by adding 1 U of Exo I and 1 U of CIAP to 3 μ L of each PCR product corrected to have 1X of the CIAP reaction buffer. This mixture was incubated for 60 min at 37°C followed by denaturation at 75°C for 15 min.

For minisequencing, each multiplex was genotyped by single-base extension reaction using the SNaPshot Multiplex System kit (Applied Biosystems, USA) following manufacturer's recommendations. A second purification step was carried out by mixing 1 U of CIAP with 5 μ L of the single-base extension reaction corrected to 1X CIAP reaction buffer, which was incubated for 1 min at 37°C and for 15 s at 85°C. Following addition of 1 μ L of each purified product to 8.83 μ L Hi-Di formamide and 0.17 μ L GS120 Liz internal size standard, capillary electrophoresis was carried on an ABI Prism 3130XL genetic analyzer (Applied Biosystems) using ABI 3700 POP 7 polymer. The obtained data were analyzed in the GeneMapper software (Applied Biosystems). Eletropherograms were rendered successful when only mild noise was observed and allowed coincident identification of the polymorphic site by two independent readers after visual inspection. Samples with less than 90% call rate were repeated, after which blanks were filled with unitary (singleplex) reactions until the entire panel of SNPs was fulfilled.

To genotype the Apolipoprotein E gene (Apo E) and determine the classic e2, e3 and e4 alleles for statistic control, a PCR method was adapted from a multiplex refractory mutation system (Donohoe et al., 1999). Quality control for the ApoE polymorphism consisted of systematic repetition of all e2- and e4-carriers. All reassessments were done by an independent technician, and genotyping success rate and concordance scored at 100%. Concentrations used and sequence of all primers are available upon request. Genetic ancestry estimates were determined for each subject exactly as described previously (Benedet et al., 2012).

Statistical analysis

Cases were labeled as positive (affected) or negative (non-affected) regarding clinical diagnose of AD. The Kolmogorov-Smirnov test was performed to check for normal distribution of the continuous variables within each group. The Student's *t* test and the Chi-square test were performed for comparison of classic clinical, social and anthropometric data across subjects affected and non-affected by AD. Crude relative risk (RR) ratios were calculated and stratified by the presence of any ϵ 4 allele and to the average level of European, Amerindian and African genetic ancestry in the sample. This latter analysis was confirmed with the chi-square test. Individual genetic

ancestry was estimated with an algorithm based on maximum likelihood estimation (Tsai et al., 2005) and determined exactly as described previously (Benedet et al., 2012). A p-value was rendered significant following to the Bonferroni correction for multiple genotypic tests ($\alpha = 0.005$). Single gene analyses within subsets were considered significant at the 0.05 level. The SPSS software, version 19 (SPSS Inc., Chicago, USA), and the Epi-Info, version 3.5.1 (Centers for Disease Control, Atlanta, USA) were used for statistical calculations.

Results

From 2009 through 2011, data from 630 participants (~ 0.32% of the whole elderly segment in Brasília; aged from 60 to 96 year-old) was gathered according to the inclusion criteria. From all participants, 120 individuals were diagnosed with AD whereas 412 subjects were identified as non-demented, cognitively healthy subjects. The remaining 98 exhibited other cognitive disorders not compatible with AD, including cases of mixed dementia, and were ruled out. To assess homogeneity among the 532 eligible for analysis, classic biological, social and clinical data considered at baseline were compared between subjects affected and non-affected by AD (Table 2). Literacy level as well as waist circumference, age and systolic blood pressure means were considered equal in both groups. Nonetheless, differences in gender and DBP were significant, with the control group being higher in diastolic pressure and overrepresented with women. As expected, ApoE ϵ 4 carriers were more frequent in AD patients (47.5%) than in cognitively normal subjects (19.7%).

On a whole-group analysis, our results show a remarkable degree of population structure given the spectrum of differing frequencies of the inflammatory SNPs in our sample compared to the parental populations (Table 1), corroborating the recent admixture of the Brazilian population. The frequency analyses indicated no significant differences in the allelic distribution of 8 out of the 10 immunological polymorphisms studied when AD patients were compared to the non-demented controls, regardless whether a dominant or a recessive model was applied (Table 3). Only carriers of the minor alleles of IL10 (-1082G) and of IL6 (-174C) genes, in recessive and dominant models respectively, exhibited an effect in predisposing to the onset of AD. When our data was evaluated using Bonferroni correction, only the

association of AD with the IL10 SNP attained statistical significance, with an almost 40% lower chance for AD among A homozygotes compared to carriers of all other genotypes as reference (RR = 0.61; $p = 0.004$).

When dichotomized in terms of $\epsilon 4$ carriers or not and for mean levels of genetic heritage, protection against AD conferred by the -1084A allele remained statistically important in 6 out the 8 scenarios devised according to a recessive model, even achieving significance in a dominant fashion among those with minor proportion of European ancestry (Table 4). On the other hand, all other SNPs investigated remained displaying non-significant association with the phenotype after this correctional effort.

Discussion

Patients with AD display a pro-inflammatory phenotype characterized by local overproduction of cytokines in the plaques as well by an increased elevation of cytokines in the cerebrospinal fluid (Bales et al., 2000; Schwab and McGeer, 2008). In this environment, microglial cells account for most of the mediators produced, and it is possible that their well acknowledged responsiveness to amyloid- β (A β) deposits trigger reactions that are proportional to transcriptional and/or translational properties of immune genes. Therefore we analyzed whether polymorphisms in ten inflammatory genes may increase the risk of AD.

The present study shows significant difference in genotypic distribution of the IL-10 -1082 SNP (rs1800896) between AD patients and non-cognitively impaired subjects. Analyses according to the Cohen convention (Cohen, 1992) confirmed differences that could be categorized as an elevated magnitude of effect size (ES) of IL10 genotypes among subjects with and without dementia (AA vs G_, ES = 1.2), whereas a rather low magnitude of ES was found for IL6 genotypes compared likewise (G_ vs. CC, ES = 0.4). In addition, the IL10 SNP almost deviated from the Hardy-Weinberg equilibrium ($P = 0.054$) when the whole group is considered. Nonetheless, the genotype distributions for all investigated genes (including IL10) were in Hardy-Weinberg equilibrium within each AD and control subset. These may be further evidences towards an association of the locus with the disease.

Physiologically, our finding is in accordance to results elsewhere that attributes the status of “high-producer” of circulating IL10 to the -1082A allele (Liu et al., 2011; Wang et al., 2011), contributing to the rationale that suppression or attenuation of neuroinflammation in susceptible subjects may protect against the onset of Alzheimer’s disease. The -1082 SNP is in complete linkage disequilibrium with variances at other positions also alleged functional as the -819 T/C (rs1800871) and the -592 C/A (rs1800872) SNPs, yielding promoter haplotypes already implicated in the risk for AD (Bagnoli et al., 2007; Scassellati et al., 2004) and others that deserve proper investigation by subsequent genomic approaches.

Apart from the well characterized role of the ApoE gene in the etiology of AD, a body of recent evidence accounts for the overall genetic heritage as additional genetic risk factor among the highly admixed Brazilian population (Benedet et al., 2012; Schlesinger et al., 2011). However, our stratified analyses did not detect an interaction between either the ApoE ϵ 4 allele or the degree of Amerindian ancestry and the genotypes of IL10, rendering the apolipoprotein alleles and native American heritage as potential confounders rather than effect-modifying variables. Still regarding ethnicity, it is noteworthy that carriers of the -1082A allele exhibited protection against AD only among those with greater African or minor European content. This suggests that allelic architectures inherent to these parental population may interact with the IL-10 gene and influence the AD phenotype, perhaps in part expressed by a number of reports that do not replicate this finding among white European individuals (Depboylu et al., 2003; Ramos et al., 2006). Being possible that the Bonferroni correction overcorrects for the inflated false-positive rate and thereby throws away valid information, similar analyses with subjects dichotomized to ApoE and ancestry were performed for genotypes of IL6, but no associations were rendered significant after these corrections. Therefore, statistical association of AD with IL6 genotypes should be regarded as borderline at this time and subjected to further investigations in different scenarios. It was established that for a sample comprising 120 AD cases and 412 control individuals, a significance level set at $\alpha = 0.005$, and an effect size between 0.4 and 1.2, the test power exceeded 80% for all of investigated variables, using the G*Power 3 software (Faul et al., 2007).

To the authors’ best knowledge, no previous report sought to investigate the relationship between a number of immunogenomic markers and the AD phenotype in

the context of (and correcting for) the high admixture and social heterogeneity of the Brazilian contingent. In our conditions, differences in gender distribution between affected and non-affected individuals probably derived from cultural aspects, since older women tend to be greater consumers of outpatient services, and older men of inpatient healthcare (Barreto et al., 2006). Lower DBP may be attributed to the frequent dysautonomia of AD patients. Despite these discrepancies, both aspects might be considered of minor interest to clinically distinguish subjects according to the main phenotype in study (AD). Regarding social profile, the high proportions of individuals with less than 4 year of formal education among demented and non-demented subjects is consistent with the general low literacy level of older adults in Brazil, and comparable frequencies in both groups attenuate disparities related to socioeconomic status.

Despite this study tends to pose a contribution by considering sociodemographic and biological characteristics, there are important limitations to acknowledge. Remarkable heterogeneity produced by differences in immune-modulating pharmacotherapy (past or present) and by the sampling method not based on the pattern of clinical evolution and severity, among other factors not considered herein, may add complexity to this scenario. Another bias akin to all associative studies rely on the fact that association does not imply causation. In this matter, we recall that the SNPs studied herein were selected based on prior evidence for functional properties, but our results should be interpreted with caution since actual genetic causation may rely on element(s) fairly adjacent and/or away from the indicated SNP.

In summary, our findings suggest that the IL10 locus affect the development of the late-onset Alzheimer's disease in a context that may be sensitive to the overall genetic heritage of Brazilian older adults. Mapping by admixture linkage disequilibrium, for instance, may be important to refine the search for elements in the genetic architecture of major continental population that can confer protection against or predispose to this form of dementia.

Acknowledgments

This work was supported by FAPDF (grant # 193.000.449-2008), Finatec/UnB (grant # 5563/2009) and DPP/UnB (UnBDoc 121696/2011) to O.T. Nóbrega. Dr. R.W. Pereira was supported by a fellowship for productivity in research from CNPq.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Statement

The authors declare minor self-plagiarism by reusing elements from published work of our own to help describing the sample, being provided appropriate reference.

Comprovante de aceite do periódico Neuroimmunomodulation.

-----Mensagem original-----

De: nim@karger.com [<mailto:nim@karger.com>]

Enviada em: segunda-feira, 4 de março de 2013 04:50

Para: otavionobrega@unb.br

Assunto: Ms. No. 201211005, Neuroimmunomodulation

Ms No.: 201211005

Title: Cytokine gene polymorphisms and the Alzheimer disease in Brazil

Dear Dr. Nóbrega,

Thank you for submitting your manuscript to "Neuroimmunomodulation". We are pleased to inform you that it has now been accepted for publication and passed on to our Production Department from whom you will hear shortly. We hope you will continue to submit work from your group to "Neuroimmunomodulation" in the future.

With kind regards,

Sandrine Maguire

Editorial Office 'Neuroimmunomodulation'

t +4161 3061360

nim@karger.com

S. Karger AG, Medical and Scientific Publishers, Allschwilerstrasse 10,
4009

Basel, Switzerland t +41 61 306 1111, f +41 61 306 1234, www.karger.com

References

- Almkvist, O., Winblad, B., 1999. Early diagnosis of Alzheimer dementia based on clinical and biological factors. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 249 Suppl 3, 3-9.
- Bagnoli, S., Cellini, E., Tedde, A., Nacmias, B., Piacentini, S., Bessi, V., Bracco, L., Sorbi, S., 2007. Association of IL10 promoter polymorphism in Italian Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 418, 262-265.
- Bales, K.R., Du, Y., Holtzman, D., Cordell, B., Paul, S.M., 2000. Neuroinflammation and Alzheimer's disease: critical roles for cytokine/Abeta-induced glial activation, NF-kappaB, and apolipoprotein E. *Neurobiol Aging* 21, 427-432; discussion 451-423.
- Barreto, S.M., Kalache, A., Giatti, L., 2006. Does health status explain gender dissimilarity in healthcare use among older adults? *Cad Saude Publica* 22, 347-355.
- Benedet, A.L., Moraes, C.F., Camargos, E.F., Oliveira, L.F., Souza, V.C., Lins, T.C., Henriques, A.D., Carmo, D.G., Machado-Silva, W., Araujo, C.N., Cordova, C., Pereira, R.W., Nobrega, O.T., 2012. Amerindian Genetic Ancestry Protects against Alzheimer's Disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 33, 311-317.
- Benedet, A.L., Moraes, C.F., Camargos, E.F., Oliveira, L.F., Souza, V.C., Lins, T.C., Henriques, A.D., Carmo, D.G.S., Machado-Silva, W., Araujo, C.N., Cordova, C., Pereira, R.W., Nobrega, O.T., Amerindian genetic ancestry protects against Alzheimer's disease. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* 33, in press.
- Bergholdt, R., Ghandil, P., Johannesen, J., Kristiansen, O.P., Kockum, I., Luthman, H., Ronningen, K.S., Nerup, J., Julier, C., Pociot, F., 2004. Genetic and functional evaluation of an interleukin-12 polymorphism (IDDM18) in families with type 1 diabetes. *J Med Genet* 41, e39.
- Bidwell, J., Keen, L., Gallagher, G., Kimberly, R., Huizinga, T., McDermott, M.F., Oksenberg, J., McNicholl, J., Pociot, F., Hardt, C., D'Alfonso, S., 1999. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases. *Genes Immun* 1, 3-19.
- Bidwell, J., Keen, L., Gallagher, G., Kimberly, R., Huizinga, T., McDermott, M.F., Oksenberg, J., McNicholl, J., Pociot, F., Hardt, C., D'Alfonso, S., 2001. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, supplement 1. *Genes Immun* 2, 61-70.
- Cardelli, M., Cavallone, L., Marchegiani, F., Oliveri, F., Dato, S., Montesanto, A., Lescai, F., Lisa, R., De Benedictis, G., Franceschi, C., 2008. A genetic-demographic approach reveals male-specific association between survival and tumor necrosis factor (A/G)-308 polymorphism. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 63, 454-460.
- Cardellini, M., Perego, L., D'Adamo, M., Marini, M.A., Procopio, C., Hribal, M.L., Andreozzi, F., Frontoni, S., Giacomelli, M., Paganelli, M., Pontiroli, A.E.,

- Lauro, R., Folli, F., Sesti, G., 2005. C-174G polymorphism in the promoter of the interleukin-6 gene is associated with insulin resistance. *Diabetes Care* 28, 2007-2012.
- Castellani, R.J., Rolston, R.K., Smith, M.A., 2010. Alzheimer disease. *Dis Mon* 56, 484-546.
- Choudhry, S., Coyle, N.E., Tang, H., Salari, K., Lind, D., Clark, S.L., Tsai, H.J., Naqvi, M., Phong, A., Ung, N., Matallana, H., Avila, P.C., Casal, J., Torres, A., Nazario, S., Castro, R., Battle, N.C., Perez-Stable, E.J., Kwok, P.Y., Sheppard, D., Shriver, M.D., Rodriguez-Cintron, W., Risch, N., Ziv, E., Burchard, E.G., 2006. Population stratification confounds genetic association studies among Latinos. *Hum Genet* 118, 652-664.
- Cohen, J., 1992. A power primer. *Psychol Bull* 112, 155-159.
- Depboylu, C., Du, Y., Muller, U., Kurz, A., Zimmer, R., Riemenschneider, M., Gasser, T., Oertel, W.H., Klockgether, T., Dodel, R.C., 2003. Lack of association of interleukin-10 promoter region polymorphisms with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 342, 132-134.
- Donohoe, G.G., Salomaki, A., Lehtimaki, T., Pulkki, K., Kairisto, V., 1999. Rapid identification of apolipoprotein E genotypes by multiplex amplification refractory mutation system PCR and capillary gel electrophoresis. *Clin Chem* 45, 143-146.
- Drineas, P., Lewis, J., Paschou, P., 2010. Inferring geographic coordinates of origin for Europeans using small panels of ancestry informative markers. *PLoS One* 5, e11892.
- Faul, F., Erdfelder, E., Lang, A.G., Buchner, A., 2007. G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods* 39, 175-191.
- Ferri, C.P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., Hall, K., Hasegawa, K., Hendrie, H., Huang, Y., Jorm, A., Mathers, C., Menezes, P.R., Rimmer, E., Sczufca, M., 2005. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 366, 2112-2117.
- Gallucci Neto, J., Tamelini, M.G., Forlenza, O.V., 2005. The differential diagnosis of dementia. *Revista de Psiquiatria Clínica* 32, 119-130.
- Giedraitis, V., He, B., Huang, W.X., Hillert, J., 2001. Cloning and mutation analysis of the human IL-18 promoter: a possible role of polymorphisms in expression regulation. *J Neuroimmunol* 112, 146-152.
- HapMap, 2005. A haplotype map of the human genome. *Nature* 437, 1299-1320.
- Heneka, M.T., Kummer, M.P., Weggen, S., Bulic, B., Multhaup, G., Munte, L., Hull, M., Pflanzner, T., Pietrzik, C.U., 2011. Molecular mechanisms and therapeutic application of NSAIDs and derived compounds in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 8, 115-131.

- Hou, C.E., Yaffe, K., Perez-Stable, E.J., Miller, B.L., 2006. Frequency of dementia etiologies in four ethnic groups. *Dement Geriatr Cogn Disord* 22, 42-47.
- Lambert, J.C., Heath, S., Even, G., Campion, D., Sleegers, K., Hiltunen, M., Combarros, O., Zelenika, D., Bullido, M.J., Tavernier, B., Letenneur, L., Bettens, K., Berr, C., Pasquier, F., Fievet, N., Barberger-Gateau, P., Engelborghs, S., De Deyn, P., Mateo, I., Franck, A., Helisalmi, S., Porcellini, E., Hanon, O., de Pancorbo, M.M., Lendon, C., Dufouil, C., Jaillard, C., Leveillard, T., Alvarez, V., Bosco, P., Mancuso, M., Panza, F., Nacmias, B., Bossu, P., Piccardi, P., Annoni, G., Seripa, D., Galimberti, D., Hannequin, D., Licastro, F., Soininen, H., Ritchie, K., Blanche, H., Dartigues, J.F., Tzourio, C., Gut, I., Van Broeckhoven, C., Alperovitch, A., Lathrop, M., Amouyel, P., 2009. Genome-wide association study identifies variants at *CLU* and *CR1* associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* 41, 1094-1099.
- Lins, T.C., Vieira, R.G., Abreu, B.S., Grattapaglia, D., Pereira, R.W., 2010. Genetic composition of Brazilian population samples based on a set of twenty-eight ancestry informative SNPs. *Am J Hum Biol* 22, 187-192.
- Lio, D., Scola, L., Romano, G.C., Candore, G., Caruso, C., 2006. Immunological and immunogenetic markers in sporadic Alzheimer's disease. *Aging Clin Exp Res* 18, 163-166.
- Liu, N., Lu, H., Tao, F., Guo, T., Liu, C., Cui, B., Ning, G., 2011. An association of interleukin-10 gene polymorphisms with Graves' disease in two Chinese populations. *Endocrine* 40, 90-94.
- Moraes, C.F., Lins, T.C., Carmargos, E.F., Naves, J.O., Pereira, R.W., Nobrega, O.T., 2012. Lessons from genome-wide association studies findings in Alzheimer's disease. *Psychogeriatrics* 12, 62-73.
- Murrell, J.R., Price, B., Lane, K.A., Baiyewu, O., Gureje, O., Ogunniyi, A., Unverzagt, F.W., Smith-Gamble, V., Gao, S., Hendrie, H.C., Hall, K.S., 2006. Association of apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease in African Americans. *Arch Neurol* 63, 431-434.
- Nassir, R., Kosoy, R., Tian, C., White, P.A., Butler, L.M., Silva, G., Kittles, R., Alarcon-Riquelme, M.E., Gregersen, P.K., Belmont, J.W., De La Vega, F.M., Seldin, M.F., 2009. An ancestry informative marker set for determining continental origin: validation and extension using human genome diversity panels. *BMC Genet* 10, 39.
- Paschou, P., Ziv, E., Burchard, E.G., Choudhry, S., Rodriguez-Cintron, W., Mahoney, M.W., Drineas, P., 2007. PCA-correlated SNPs for structure identification in worldwide human populations. *PLoS Genet* 3, 1672-1686.
- Pasinetti, G.M., 2002. From epidemiology to therapeutic trials with anti-inflammatory drugs in Alzheimer's disease: the role of NSAIDs and cyclooxygenase in beta-amyloidosis and clinical dementia. *J Alzheimers Dis* 4, 435-445.
- Pena, S.D., Di Pietro, G., Fuchshuber-Moraes, M., Genro, J.P., Hutz, M.H., Kehdy Fde, S., Kohlrausch, F., Magno, L.A., Montenegro, R.C., Moraes, M.O., de Moraes, M.E., de Moraes, M.R., Ojopi, E.B., Perini, J.A., Racciopi, C., Ribeiro-

- Dos-Santos, A.K., Rios-Santos, F., Romano-Silva, M.A., Sortica, V.A., Suarez-Kurtz, G., 2011. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One* 6, e17063.
- Pociot, F., Molvig, J., Wogensen, L., Worsaae, H., Nerup, J., 1992. A TaqI polymorphism in the human interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene correlates with IL-1 beta secretion in vitro. *Eur J Clin Invest* 22, 396-402.
- Pociot, F., Ronningen, K.S., Bergholdt, R., Lorenzen, T., Johannesen, J., Ye, K., Dinarello, C.A., Nerup, J., 1994. Genetic susceptibility markers in Danish patients with type 1 (insulin-dependent) diabetes--evidence for polygenicity in man. Danish Study Group of Diabetes in Childhood. *Autoimmunity* 19, 169-178.
- Ramos, E.M., Lin, M.T., Larson, E.B., Maezawa, I., Tseng, L.H., Edwards, K.L., Schellenberg, G.D., Hansen, J.A., Kukull, W.A., Jin, L.W., 2006. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 10 promoter region polymorphisms and risk of late-onset Alzheimer disease. *Arch Neurol* 63, 1165-1169.
- Scassellati, C., Zanardini, R., Squitti, R., Bocchio-Chiavetto, L., Bonvicini, C., Binetti, G., Zanetti, O., Cassetta, E., Gennarelli, M., 2004. Promoter haplotypes of interleukin-10 gene and sporadic Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 356, 119-122.
- Schlesinger, D., Grinberg, L.T., Alba, J.G., Naslavsky, M.S., Licinio, L., Farfel, J.M., Suemoto, C.K., de Lucena Ferretti, R.E., Leite, R.E., de Andrade, M.P., Dos Santos, A.C., Brentani, H., Pasqualucci, C.A., Nitrini, R., Jacob-Filho, W., Zatz, M., 2011. African ancestry protects against Alzheimer's disease-related neuropathology. *Mol Psychiatry*.
- Schwab, C., McGeer, P.L., 2008. Inflammatory aspects of Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *J Alzheimers Dis* 13, 359-369.
- Smith, M.A., 1998. Alzheimer disease. *Int Rev Neurobiol* 42, 1-54.
- Tagore, A., Gonsalkorale, W.M., Pravica, V., Hajeer, A.H., McMahon, R., Whorwell, P.J., Sinnott, P.J., Hutchinson, I.V., 1999. Interleukin-10 (IL-10) genotypes in inflammatory bowel disease. *Tissue Antigens* 54, 386-390.
- Tian, C., Gregersen, P.K., Seldin, M.F., 2008. Accounting for ancestry: population substructure and genome-wide association studies. *Hum Mol Genet* 17, R143-150.
- Tsai, H.J., Choudhry, S., Naqvi, M., Rodriguez-Cintron, W., Burchard, E.G., Ziv, E., 2005. Comparison of three methods to estimate genetic ancestry and control for stratification in genetic association studies among admixed populations. *Hum Genet* 118, 424-433.
- Tuppo, E.E., Arias, H.R., 2005. The role of inflammation in Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 289-305.

- Venketasubramanian, N., Sahadevan, S., Kua, E.H., Chen, C.P., Ng, T.P., 2010. Interethnic differences in dementia epidemiology: global and Asia-Pacific perspectives. *Dement Geriatr Cogn Disord* 30, 492-498.
- Wan, Y., Wang, G., Chen, S.D., 2008. Genetic predisposition to inflammation: a new risk factor of Alzheimer's disease. *Neurosci Bull* 24, 314-322.
- Wang, A.H., Lam, W.J., Han, D.Y., Ding, Y., Hu, R., Fraser, A.G., Ferguson, L.R., Morgan, A.R., 2011. The effect of IL-10 genetic variation and interleukin 10 serum levels on Crohn's disease susceptibility in a New Zealand population. *Hum Immunol* 72, 431-435.

Anexo 6 - Produção científica durante o Doutorado.

1. [doi>](#) **MORAES, Clayton Franco** ; LINS, Tulio C. ; CARMARGOS, Einstein F. ; NAVES, Janeth O. S. ; PEREIRA, Rinaldo W. ; Nóbrega, Otávio T. . Lessons from genome-wide association studies findings in Alzheimer's disease. *Psychogeriatrics (Tokyo)* ^{JCR}, v. 12, p. 62-73, 2012.

2. ★ Benedet, A. L. ; **MORAES, Clayton Franco** ; CARMARGOS, Einstein F. ; OLIVEIRA, Larissa F. ; Souza, Vinícius C. ; LINS, Tulio C. ; Henriques, A.D. ; Carmo, D.G.S. ; Silva, W.M ; ARAÚJO, Carla N. ; [Córdova, C.](#) ; PEREIRA, Rinaldo W. ; [Nóbrega, O.T.](#) . Amerindian genetic ancestry protects against Alzheimer s disease.. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* ^{JCR}. v. 33, p. 311-317, 2012.