

Patrícia Natália Oliveira da Silva

**ANÁLISE DA METILAÇÃO GLOBAL E METILAÇÃO DOS
GENES *DPYSL2*, *CNP*, *HSPA8* E *HSPA9*, E
SUA INFLUÊNCIA NA EXPRESSÃO GÊNICA
EM PACIENTES COM DOENÇA DE ALZHEIMER**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola Paulista
de Medicina, para obtenção do Título de
Doutor em Ciências

São Paulo
2012

Patrícia Natália Oliveira da Silva

**ANÁLISE DA METILAÇÃO GLOBAL E METILAÇÃO DOS
GENES *DPYSL2*, *CNP*, *HSPA8* E *HSPA9*, E
SUA INFLUÊNCIA NA EXPRESSÃO GÊNICA
EM PACIENTES COM DOENÇA DE ALZHEIMER**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola Paulista
de Medicina, para obtenção do Título
de Doutor em Ciências

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marília de
Arruda Cardoso Smith

São Paulo
2012

Silva, Patrícia Natália Oliveira

Análise da metilação global e metilação dos genes *DPYSL2*, *CNP*, *HSPA8* e *HSPA9*, e sua influência na expressão gênica em pacientes com Doença de Alzheimer/Patrícia Natália Oliveira da Silva.-- São Paulo, 2012.

xxi, 131f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Morfologia e Genética.

Título em inglês: Global methylation analysis and *DPYSL2*, *CNP*, *HSPA8* and *HSPA9* gene methylation, and their influences on gene expression of Alzheimer's Disease patients.

1. Doença de Alzheimer. 2. Metilação de DNA. 3. Expressão gênica. 4. Cérebro. 5. Sangue.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
Programa de Pós-Graduação em Morfologia e Genética

Chefe da Disciplina de Genética:

Prof^a. Dr^a. Marília de Arruda Cardoso Smith

Chefe do Departamento de Morfologia e Genética:

Prof^a. Dr^a. Sima Godosevicius

Coordenadora do Curso de Pós-graduação:

Prof^a. Dr^a. Janete Maria Cerutti

Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina

Reitor: Prof. Dr. Walter Manna Albertoni

Vice-Reitor: Prof. Dr. Ricardo Luiz Smith

Chefe de Gabinete: Prof. Dr. Manoel João Batista Castello Girão

Patrícia Natália Oliveira da Silva

**ANÁLISE DA METILAÇÃO GLOBAL E METILAÇÃO DE GENES
CANDIDATOS E SUA INFLUÊNCIA NA EXPRESSÃO GÊNICA
EM PACIENTES COM DOENÇA DE ALZHEIMER.**

Presidente da banca: Prof^a. Dr^a. Marília de Arruda Smith

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Helena Paula Brentani
Prof^a. Dr^a. Elza Tieme Sakamoto Hojo
Prof. Dr. Spencer Luiz Marques Payão
Prof. Dr. Luis Garcia Alonso

SUPLENTES

Prof^a. Dr^a. Denise Maria Christofolini
Prof^o. Dr. Paulo Henrique Ferreira Bertolucci

Aprovada em: 30/03/2012

Este estudo foi desenvolvido nas seguintes instituições:

Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina (UNIFESP/EPM)
Departamento de Morfologia e Genética
Disciplina de Genética

Universidade de Londres (*London University*)
King's College London
Instituto de Psiquiatria - IOP

Auxílio financeiro:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Bolsa de doutorado (2008-2012)

Bolsa do Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior (PDEE)

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

Auxílio regular à pesquisa: processo número 14151-5

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Auxílio à pesquisa: processo número 474561/2007-0 – Edital

MCT/CNPq nº15/2007

“Eu aprendi que a melhor sala de aula do mundo está aos pés de uma pessoa mais velha”.
William Shakespeare

"Faz o que for justo. O resto virá por si só."
Johan Wolfgang Von Goethe

Para minha vózica, que sempre teve
uma aula a me ensinar;

Para meus pais,
Eunice e José, por todo apoio e
amor em minha jornada acadêmica.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Marília de Arruda Cardoso Smith, por todos os ensinamentos e conhecimentos que me transmitiu, pela confiança em meu trabalho e principalmente, pela oportunidade de crescimento que me proporcionou ao me receber de braços abertos há quase sete anos.

Ao Dr. Jonathan Mill e a todo o grupo do *King's College* em Londres – Ruth Pidsley, Emma Dempster e Catherine Fernandes, pela paciência e generosidade que contribuíram muito para meu crescimento acadêmico e pessoal.

Ao Prof. Dr. Spencer Payão, pela colaboração e apoio. Muito obrigada à equipe da FAMEMA: Roger e Lucas, pela paciência e gentileza sempre!

Aos pacientes com Doença de Alzheimer e idosos, principal alvo desta investigação científica, e seus familiares pela confiança em nosso trabalho.

Ao Prof. Dr. Gustavo Turecki, pela colaboração e amostras de cérebro fornecidas pelo Brain Bank - Douglas Hospital Research Center (Montreal, Canadá).

Ao Dr Paulo Bertolucci, pela colaboração no recrutamento dos pacientes com Doença de Alzheimer pelo Departamento de Neurologia da UNIFESP.

Às professoras Maria Isabel Melaragno e Gianna Carvalheira, pela amizade e por todos os ensinamentos!

Às amigas e amigos da Disciplina de Genética: Denise, Sintia, Mariana, Fernanda Wis, Tuty, Diego, Ianna, Vanessa, Fernanda Bellucco, Dani (mana), Léo, Renata, Stella, Bianca, Leslie, Carol, Thaís (obrigada especial por me receber em sua casa), Tatinha, Roberta, Flavinha, Núbia; Marquinhos, Mari Moisés, Zulu, Belisa, Letícia, Ana Rosa, Luara, Betty, Fabrício... Obrigada pela amizade e convivência diária; por me permitirem aprender com vocês... E claro, por podermos rir de tudo juntos no final.

Às professoras e funcionárias Janete Cerutti, Mônica Lipay, Dértia Freire-Maia, Sílvia Toledo, Mara, Regina, Cleidoca, Sylvinha, Severina, Sílvia e Fátima por toda ajuda e amizade durante esses quatro anos de doutorado.

À amiga Camila Guindalini, por ter me apresentado “um mundo novo e maravilhoso da estatística”, pelo apoio em minha ida ao *King's College* e por ser uma pessoa tão generosa!

Aos meus queridos amigos: Tuty e Diego, pela amizade e compreensão... Obrigada por me ajudarem tanto (como psicólogos e estatísticos) e estarem sempre presentes em minha vida!

À amiga Ianna, por me apresentar a realidade dos ambulatórios; por ser a médica mais humana que conheço... Obrigada pela amizade que nasceu a partir do nosso trabalho!

À minha querida amiga Mariana “Maricota” por toda a ajuda em minha vida acadêmica; você é uma profissional maravilhosa que eu admiro demais; obrigada por ser também minha amiga!

À amiga “Sintchona”; cuja carreira e bondade servem de exemplo para mim. Obrigada por me emprestar sua família, por sempre me incentivar e acolher. Obrigada amiga!

À amiga “Zeni”, parceira de todas as horas, com quem já ri e chorei muito. Obrigada por estar sempre ao meu lado.

À amiga Renata “Bixete”; minha amiga guerreira! Por sempre me ajudar e acreditar em mim... E ainda atuar como “santa casamenteira” nas horas vagas.

À minha amiga e ex-marida Tchizona; obrigada pelos maravilhosos anos de convivência e pela amizade-irmandade. Você mora no meu coração.

Aos amigos Fê Wis e Léo; pelas risadas, broncas, pelos conselhos... Obrigada pela amizade e por me receberem nas suas vidas – e no seu prédio também!

Às minhas grandes amigas: “Juju Santos”, Fe Bellucco, Cris e Van - obrigada pelo colo, pelos exemplos de vida, pelas conversas... Tenho muito orgulho de tê-las na minha vida.

Aos amigos “brasileiros e simpatizantes” de Londres: Emérita, Clarissa, Maurício, Nikki, Gail, Agnes, Jose e Renata; com quem pude dividir alegrias e tristezas (mais alegrias do que tristezas) nas terras da rainha; obrigada por me receberem e acolherem; e pela certeza de que amizade é algo “atemporal”.

Aos meus familiares: Tias amadas - Ina, Soninha, Uca, Dela, Hosana; tios - Ed e Sérgio, primos e primas-irmãs - Pri, Tathizoca, Fá, Dani e minha cunhada Naudi; obrigada pelas imensas demonstrações de carinho e apoio; obrigada por serem um grande porto seguro.

Ao meu avô Geraldo e minha “vózica” Dadá; que foram alegrar o céu recentemente – muito obrigada por não me deixarem esquecer quem sou; de onde vim e o que quero ser.

Ao Rafa, meu namorado, por todo amor e paciência. Obrigada por ser um grande amigo e sempre incentivar meu crescimento. Sem você, não sei se seria capaz de passar por tudo isso “inteira”. Obrigada a você e sua família (Zilda e Paulo) por tudo que fizeram por mim! “T amo junto”.

Ao Dani, meu “irmão-gêmeo caçula”, obrigada por ser meu maior exemplo de amor e dedicação a um ideal. Obrigada por todo amor, graça e chamego que me cercam graças a você!

Ao Marcelo, meu “gordinho” que sempre me protegeu desde pequenina... “Quando eu ainda usava lancheirinha” ele sempre diz... Por ser um grande homem e ter um grande coração, tenho muito orgulho de ser sua irmã!

Aos meus pais José e Eunice, por serem meus heróis, meus maiores amigos e incentivadores. Obrigada por sempre ter um colinho e um bom exemplo para dar, obrigada por me ensinarem tanto todos os dias: lições de garra, de fé, de amor ao próximo... Sem vocês este sonho não teria sequer começado. Amo muito vocês.

Por fim, meu agradecimento a Deus, que tantas vezes foi questionado por minhas teorias científicas, mas que nunca abandonou meu coração.

Muito obrigada a todos!

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	VII
AGRADECIMENTOS.....	VIII
SUMÁRIO.....	X
LISTA DE FIGURAS.....	XII
LISTA DE TABELAS.....	XV
LISTA DE UNIDADES.....	XVIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	XIX
RESUMO.....	XX
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 OBJETIVOS.....	2
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1 ENVELHECIMENTO.....	4
2.2 DOENÇA DE ALZHEIMER.....	6
2.2.1 Características Gerais.....	6
2.2.2 Aspectos clínicos e neuropatológicos.....	7
2.2.3 Aspectos Genéticos.....	10
2.3 EPIGENÉTICA.....	11
2.4 EXPRESSÃO GÊNICA COMO FERRAMENTA PARA DESCOBERTA DE BIOMARCADORES.....	14
2.5 METILAÇÃO DO DNA NO ENVELHECIMENTO E NA DA.....	16
2.6 METILAÇÃO E IMPLICAÇÕES TERAPÊUTICAS EM DA.....	19
2.7 GENES E SEQUÊNCIAS DE DNA SELECIONADOS PARA O PRESENTE ESTUDO.....	20
2.7.1 DPYSL2 (<i>Dihydropyrimidinase-like 2</i>).....	20
2.7.2 CNP (<i>2',3'-Cyclic Nucleotide 3' Phosphodiesterase</i>).....	21
2.7.3 HSPA8 (<i>Heat Shock 70kDa Protein 8</i>) HSPA9 (<i>Heat Shock 70kDa Protein 9</i>).....	23
2.7.4 LINE1 (<i>Long Interspersed Nuclear Element 1 ou L1</i>).....	24
3 MÉTODOS.....	27
3.1 CASUÍSTICA.....	27
3.1.1 Sangue periférico.....	27
3.1.2 Tecido cerebral.....	28
3.2 METODOLOGIA.....	29
3.2.1 Extração de RNA e síntese de cDNA.....	30
3.2.2 qRT-PCR (<i>quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>).....	31
3.2.3 Análise estatística dos dados de expressão gênica.....	34
3.2.4 Extração de DNA.....	35
3.2.5 Genotipagem das amostras para o gene APOE.....	36
3.2.6 Modificação do DNA por bissulfito de sódio.....	36
3.2.7 Análise de metilação por espectrometria de massa.....	37
3.2.7.1 Desenho de <i>primers</i>	37
3.2.7.2 Amplificação gênica para determinação de metilação.....	38
3.2.7.3 Purificação dos produtos de PCR, transcrição <i>in vitro</i> e clivagem enzimática.....	39
3.2.7.4 Espectrometria de massa usando Sequenom-Epityper.....	40
3.2.8 Análise de metilação global por Pirosequenciamento.....	40
3.2.9 Análise estatística dos dados de metilação.....	42
4 RESULTADOS.....	44
4.1 ANÁLISE DA EXPRESSÃO E DA METILAÇÃO DE GENES CANDIDATOS.....	44
4.1.1 DPYSL2.....	44
4.1.1.1 Análise de expressão e metilação em sangue periférico.....	44
4.1.1.2 Análise de expressão e metilação em tecido cerebral.....	45
4.1.1.3 Comparação da expressão e da metilação entre sangue periférico e tecido cerebral.....	50
4.1.2 CNP.....	51
4.1.2.1 Expressão e metilação em sangue periférico.....	51
4.1.2.2 Expressão e metilação em tecido cerebral.....	55

4.1.2.3 Comparação da expressão e metilação entre sangue periférico e tecido cerebral.....	57
4.1.3 <i>HSPA8</i>	59
4.1.3.1 Análise de expressão e metilação em sangue periférico.....	59
4.1.3.2 Análise de expressão e metilação em tecido cerebral.....	63
4.1.3.3 Comparação da expressão e metilação entre sangue periférico e tecido cerebral.....	66
4.1.4 <i>HSPA9</i>	67
4.1.4.1 Análise de expressão e metilação em sangue periférico.....	67
4.1.4.2 Análise de expressão e metilação em tecido cerebral.....	71
4.1.4.3 Comparação da expressão e metilação entre linfócitos de sangue periférico e tecido cerebral	74
4.2 ANÁLISE DA METILAÇÃO DE SEQUÊNCIAS <i>LINE1</i>	75
5 DISCUSSÃO	78
5.1 <i>DPYSL2</i>	78
5.2 <i>CNP</i>	80
5.3 <i>HSPA8</i> E <i>HSPA9</i>	82
5.4 <i>LINE1</i>	85
6 CONCLUSÕES	88
7 ANEXOS	900
8 REFERÊNCIAS	114
ABSTRACT	123
APÊNDICES.....	124
BIBLIOGRAFIA CONSULTADA.....	131

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. População (em milhões de habitantes) de crianças (0 a 14 anos), jovens e adultos (15 a 59 anos) e idosos (60 anos ou mais) estimada para o período de 1940 a 2050 no Brasil.....4

Figura 2. Estimativa global da incidência de demência para as próximas décadas.....5

Figura 3. Placas senis e Novelas neurofibrilares observados no córtex cerebral de paciente com a Doença de Alzheimer.....8

Figura 4. Adição de um grupo metil ao carbono 5' do anel pirimídico de uma citosina por ação de uma DNA metiltransferase.....12

Figura 5. Silenciamento da transcrição gênica pela ação de eventos epigenéticos em ilhas CpGs do DNA.....13

Figura 6. Ciclo de transmetilação. A metionina é convertida em S-adenosil-metionina (SAM), que posteriormente doa um grupo metil para diversos componentes bioquímicos.....18

Figura 7. Resumo das técnicas realizadas no estudo e respectivas amostras utilizadas....30

Figura 8. Amplificação por qRT-PCR, por meio do princípio do ensaio TaqMan.....33

Figura 9. Análise de *primers* no pacote estatístico R para a predição de sequências com sobreposição de massa.....38

Figura 10. Resumo das etapas prévias à espectrometria de massa: Amplificação, transcrição e clivagem enzimática.....39

Figura 11. Expressão de *DPYSL2* em sangue periférico.....44

Figura 12. Epigrama ilustrativo resultante da análise de espectrometria de massa para o gene *DPYSL2* de 41 amostras aleatoriamente dispostas dos indivíduos jovens, idosos e de pacientes com Doença de Alzheimer.46

Figura 13. Expressão de *DPYSL2* nas três regiões cerebrais de pacientes com DA e idosos saudáveis.....47

Figura 14.	Expressão de <i>DPYSL2</i> em tecido cerebral em pacientes com Doença de Alzheimer e em idosos saudáveis.....	48
Figura 15.	Expressão de <i>DPYSL2</i> em sangue periférico e tecido cerebral em idosos saudáveis.....	50
Figura 16.	Expressão de <i>CNP</i> em sangue periférico.....	51
Figura 17.	Epigrama ilustrativo resultante da análise de espectrometria de massa para o gene <i>CNP</i> de 43 amostras aleatoriamente dispostas dos indivíduos jovens, idosos e de pacientes com Doença de Alzheimer.....	53
Figura 18.	Expressão de <i>CNP</i> nas três regiões cerebrais de pacientes com DA e idosos saudáveis.....	55
Figura 19.	Expressão <i>CNP</i> em tecido cerebral em pacientes com Doença de Alzheimer e em idosos saudáveis.....	56
Figura 20.	Expressão de <i>CNP</i> em sangue periférico e tecido cerebral em idosos saudáveis.....	58
Figura 21.	Expressão de <i>CNP</i> em sangue periférico e tecido cerebral em pacientes com Doença de Alzheimer.....	60
Figura 22.	Expressão de <i>HSPA8</i> em sangue periférico.....	61
Figura 23.	Epigrama ilustrativo resultante da análise de espectrometria de massa para o gene <i>HSPA8</i> de 40 amostras aleatoriamente dispostas dos indivíduos jovens, idosos e de pacientes com Doença de Alzheimer.....	63
Figura 24.	Expressão de <i>HSPA8</i> nas três regiões cerebrais em tecido cerebral de pacientes com DA e idosos saudáveis.....	64
Figura 25.	Expressão de <i>HSPA8</i> em tecido cerebral em pacientes com Doença de Alzheimer e em idosos saudáveis.....	66
Figura 26.	Expressão de <i>HSPA9</i> em sangue periférico.....	71
Figura 27.	Epigrama ilustrativo resultante da análise de espectrometria de massa para o gene <i>HSPA9</i> de 42 amostras aleatoriamente dispostas dos indivíduos jovens, idosos e de pacientes com Doença de Alzheimer.....	72

Figura 28. Expressão de *HSPA9* nas três regiões cerebrais de pacientes com DA e idosos saudáveis.....74

Figura 29. Expressão de *HSPA9* em tecido cerebral em pacientes com Doença de Alzheimer e em idosos saudáveis.....49

Figura 30. Expressão de *HSPA9* em sangue periférico e tecido cerebral em idosos saudáveis49

Figura 31. Porcentagens médias de metilação de *LINE1* entre pacientes com Doença de Alzheimer e idosos saudáveis.....76

Figura 32. Porcentagens médias de metilação de *LINE1* em córtex auditivo, córtex entorrinal e hipocampo de (A) pacientes com Doença de Alzheimer e (B) do grupo de idosos saudáveis.....76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Genes envolvidos no desenvolvimento da Doença de Alzheimer, localização cromossômica, valores de risco relativo e respectivas referências.....11

Tabela 2. Caracterização das amostras de sangue periférico de jovens, idosos saudáveis e pacientes com Doença de Alzheimer e de tecido cerebral de idosos saudáveis e pacientes com Doença de Alzheimer.....29

Tabela 3. Distribuição dos alelos do gene *APOE* em todos os indivíduos avaliados no estudo.....36

Tabela 4. Expressão do gene *DPYSL2* em sangue periférico do grupo de pacientes com Doença de Alzheimer, de idosos saudáveis e de jovens.....44

Tabela 5. Expressão do gene *DPYSL2* nas três regiões cerebrais de pacientes com Doença de Alzheimer e de idosos saudáveis.....47

Tabela 6. Metilação do gene *DPYSL2* nas diferentes regiões cerebrais do grupo de pacientes com Doença de Alzheimer e grupo de idosos saudáveis.....47

Tabela 7. Expressão do gene *DPYSL2* em tecido cerebral de pacientes com Doença de Alzheimer e de idosos saudáveis.....48

Tabela 8. Metilação do gene *DPYSL2* em tecido cerebral de pacientes com Doença de Alzheimer e de idosos saudáveis.....48

Tabela 9. Expressão do gene *DPYSL2* em sangue periférico e tecido cerebral de pacientes com Doença de Alzheimer e de idosos saudáveis.....49

Tabela 10. Expressão do gene *CNP* em sangue periférico de pacientes com Doença de Alzheimer, de idosos saudáveis e de jovens.....51

Tabela 11. Metilação do gene *CNP* em sangue periférico de pacientes com Doença de Alzheimer, de idosos saudáveis e de jovens.....52

Tabela 12. Expressão do gene *CNP* nas três regiões cerebrais de pacientes com Doença de Alzheimer e de idosos saudáveis..... 54

Tabela 13. Metilação do gene *CNP* nas três regiões cerebrais de pacientes com Doença de Alzheimer e de idosos saudáveis.....55

Tabela 14.	Expressão do gene <i>CNP</i> em tecido cerebral de pacientes com Doença de Alzheimer e de idosos saudáveis.....	56
Tabela 15.	Metilação do gene <i>CNP</i> no tecido cerebral de pacientes com Doença de Alzheimer e de idosos saudáveis.....	56
Tabela 16.	Expressão do gene <i>CNP</i> em sangue periférico e tecido cerebral de pacientes com Doença de Alzheimer e de idosos saudáveis.....	57
Tabela 17.	Metilação do gene <i>CNP</i> em sangue periférico e tecido cerebral de pacientes com Doença de Alzheimer e de idosos saudáveis.....	58
Tabela 18.	Expressão do gene <i>HSPA8</i> em sangue periférico de pacientes com Doença de Alzheimer, de idosos saudáveis e de jovens.....	59
Tabela 19.	Metilação do gene <i>HSPA8</i> em sangue periférico do grupo de pacientes com Doença de Alzheimer, de idosos saudáveis e de jovens.....	60
Tabela 20.	Expressão do gene <i>HSPA8</i> nas três regiões cerebrais de pacientes com Doença de Alzheimer e de idosos saudáveis.....	63
Tabela 21.	Metilação do gene <i>HSPA8</i> nas três regiões cerebrais de pacientes com Doença de Alzheimer e de idosos saudáveis.....	63
Tabela 22.	Expressão do gene <i>HSPA8</i> em tecido cerebral de pacientes com Doença de Alzheimer e de idosos saudáveis.....	64
Tabela 23.	Metilação do gene <i>HSPA8</i> no tecido cerebral de pacientes com Doença de Alzheimer e de idosos saudáveis.....	64
Tabela 24.	Expressão do gene <i>HSPA8</i> em sangue periférico e tecido cerebral de pacientes com Doença de Alzheimer e de idosos saudáveis.....	66
Tabela 25.	Metilação do gene <i>HSPA8</i> em sangue periférico e tecido cerebral de pacientes com Doença de Alzheimer e de idosos saudáveis.....	66
Tabela 26.	Expressão do gene <i>HSPA9</i> em sangue periférico de pacientes com Doença de Alzheimer, de idosos saudáveis e de jovens.....	68
Tabela 27.	Metilação do gene <i>HSPA9</i> em sangue periférico de pacientes com Doença de Alzheimer, de idosos saudáveis e de jovens.....	68

Tabela 28.	Expressão do gene <i>HSPA9</i> nas três regiões cerebrais de pacientes com Doença de Alzheimer e de idosos saudáveis.....	71
Tabela 29.	Metilação do gene <i>HSPA9</i> nas três regiões cerebrais de pacientes com Doença de Alzheimer e de idosos saudáveis.....	71
Tabela 30.	Expressão do gene <i>HSPA9</i> em tecido cerebral de pacientes com Doença de Alzheimer e de idosos saudáveis.....	72
Tabela 31.	Metilação do gene <i>HSPA9</i> no tecido cerebral de pacientes com Doença de Alzheimer e de idosos saudáveis.....	72
Tabela 32.	Expressão do gene <i>HSPA9</i> em sangue periférico e tecido cerebral de pacientes com Doença de Alzheimer e de idosos saudáveis.....	74
Tabela 33.	Metilação do gene <i>HSPA9</i> em sangue periférico e tecido cerebral de pacientes com Doença de Alzheimer e de idosos saudáveis.....	74
Tabela 34.	Médias de metilação de <i>LINE1</i> nas três regiões cerebrais de pacientes com DA e idosos saudáveis.....	76

LISTA DE UNIDADES

g	Aceleração gravitacional
kDa	Quilodalton
mg	Miligramas
min	Minutos
mL	Mililitros
ng	Nanogramas
pb	Pares de base
s	Segundos
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
μL	Microlitros
Da	Dalton

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTB	β actina
APOE	Apolipoproteína E
APP	Proteína Precursora β -Amilóide
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CDRs	Coeficientes de demência
C_T	<i>Cycle threshold</i>
DA	Doença de Alzheimer
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
DP	Desvio Padrão
DSM-IV	<i>IV Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
MEEM	Mini-Exame do Estado Mental
N	Número de indivíduos
PSEN1	Presenilina 1
PSEN2	Presenilina 2
QR	Quantificação relativa
qRT-PCR	<i>Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
RNA	Ácido ribonucléico
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
SNC	Sistema Nervoso Central
SP1	<i>Specificity protein 1</i>
β A	β -Amilóide
$\Delta\Delta C_T$	Método <i>cycle threshold</i> comparativo
♀	Sexo feminino
♂	Sexo masculino
DNMT	DNA metiltransferase
HDAC	Histona desacetilase
HYC	Homocisteína
rpm	Rotações por minuto
SAH	S-adenosil-homocisteína
SAM	S-adenosil-metionina
HMT	Histona metiltransferase

RESUMO

Objetivos: Este estudo teve como objetivo avaliar a expressão e a regulação epigenética dos genes *DPYSL2*, *CNP*, *HSPA8* e *HSPA9* na Doença de Alzheimer (DA) e quantificar a metilação de sequências *LINE1* no tecido cerebral de pacientes e controles. **Métodos:** A quantificação de RNAm foi realizada por meio de qRT-PCR e os padrões de metilação foram determinados por espectrometria de massa e pirosequenciamento. Foram avaliadas três regiões cerebrais *post mortem* (córtex entorrinal, córtex auditivo e hipocampo) de cerca de 10 pacientes com Doença de Alzheimer e 10 idosos saudáveis, assim como sangue periférico de cerca de 20 jovens, 20 idosos saudáveis e 30 pacientes com DA. **Resultados:** No sangue periférico os genes *DPYSL2*, *CNP* foram mais expressos em indivíduos jovens e os genes *HSPA8* e *HSPA9* foram mais expressos em pacientes com DA, em relação aos demais grupos. A expressão dos genes *DPYSL2*, *CNP*, *HSPA8* e *HSPA9* foi menor no córtex auditivo, no córtex entorrinal e no hipocampo de pacientes com DA do que em idosos controles, não diferindo entre si no grupo de pacientes com DA e no grupo de idosos. Entre os tecidos sangue e cérebro de pacientes e de idosos controles, os genes *DPYSL2* e *CNP* foram mais expressos em sangue, enquanto que as chaperonas *HSPA8* e *HSPA9* foram mais expressas no cérebro. **Conclusões:** A maior expressão dos genes *DPYSL2* e *CNP* em sangue periférico de jovens pode estar relacionada a uma maior proliferação do sistema imunológico ou a atuação desses genes em vias ainda não conhecidas. Já a expressão aumentada das chaperonas no sangue pode estar associada a uma resposta ao estresse oxidativo observado na doença. As diferenças nos níveis de RNAm observadas entre o sangue e o cérebro de pacientes e de controles podem ser decorrentes de funções tecido-específicas. A diminuição da expressão dos quatro genes no tecido cerebral de pacientes com DA em relação aos idosos, pode indicar uma participação destes genes na fisiopatologia da doença, atuando na morte neuronal, na modulação de sinais extracelulares e no acúmulo de proteínas no cérebro. Os níveis aumentados de metilação das sequências *LINE1* devem estar relacionados ao desenvolvimento da DA, porém, a metilação dos promotores de genes candidatos não parece ser o mecanismo responsável pelo controle da expressão gênica em pacientes e controles.

1 INTRODUÇÃO

O aumento da expectativa de vida resultou em um significativo crescimento da população idosa mundial e, por isso, acarretou no aumento da incidência de doenças associadas ao envelhecimento (1). Estima-se que, em 2050, haja cerca de dois bilhões de habitantes com 60 anos ou mais em todo o mundo, sendo que o Brasil deterá 64 milhões desse total (2).

A Doença da Alzheimer (DA) é a demência mais comum em todo o mundo e afeta 6% da população com mais de 65 anos (3). Em 2010, o impacto econômico da demência no mundo foi de US\$ 604 bilhões, superando os gastos pessoais com câncer ou doenças cardíacas (1).

A DA resulta em perda irreversível de neurônios, principalmente no córtex e no hipocampo. Seus aspectos clínicos envolvem o prejuízo progressivo da memória, do julgamento, da tomada de decisões, da orientação temporoespacial e da linguagem. O diagnóstico provável dessa doença está baseado no exame neurológico e na exclusão de outros casos de demência, porém o diagnóstico definitivo pode ser realizado somente por meio de avaliação *post mortem* do cérebro. As duas principais características patológicas da DA são a presença de placas senis e deovelos neurofibrilares no cérebro (4).

Geneticamente, a DA é heterogênea e complexa, e apresenta diferentes formas de herança. A DA de acometimento precoce (antes dos 60-65 anos) possui herança autossômica dominante e está associada a mutações em três genes relacionados à produção e eliminação da proteína β -amilóide (5, 6). A DA de acometimento tardio, ou esporádico, apresenta herança complexa, com influência de fatores genéticos e ambientais (7).

Atualmente, é constante a busca por marcadores biológicos que possam prever se um indivíduo irá desenvolver a DA, ou, em qual estágio da doença o paciente encontra-se. Um marcador como esse, poderia auxiliar na conduta clínica, além de ser um possível alvo para novas drogas que busquem a diminuição do declínio cognitivo (8).

A epigenética é definida como alterações herdadas, mitótica ou meioticamente, na expressão gênica e que não resultaram de modificações na sequência de DNA (9). Fatores epigenéticos têm sido apontados recentemente como moduladores do fenótipo resultante da DA, mesmo quando mutações específicas são a causa dessa doença (10, 11).

A metilação do DNA é um mecanismo de silenciamento epigenético em mamíferos. Genes ativamente transcritos, geralmente, apresentam hipometilação da região promotora, enquanto que genes silenciados possuem abundante metilação nessa região (12).

Dessa forma, o presente estudo propôs a análise da expressão dos genes *DPYSL2*, *CNP*, *HSPA8* e *HSPA9*, selecionados de acordo com suas funções e/ou envolvimento em processos relacionados ao envelhecimento e à DA. Quando identificada diferença de expressão nos diferentes tecidos e regiões cerebrais, foi realizada a análise da metilação dos promotores gênicos, a fim de investigar uma possível regulação epigenética na doença. Adicionalmente, foi avaliado se o padrão de metilação global em regiões cerebrais é alterado durante o processo de envelhecimento e na DA.

1.1 Objetivos

1. Comparar a expressão e os níveis de metilação dos genes *DPYSL2*, *CNP*, *HSPA8* e *HSPA9* em sangue periférico entre jovens, idosos saudáveis e pacientes com DA.
2. Comparar a expressão e os níveis de metilação dos genes *DPYSL2*, *CNP*, *HSPA8* e *HSPA9* em tecido cerebral *post mortem* de três regiões – córtices entorrinal e auditivo e hipocampo – entre idosos saudáveis e pacientes com DA.
3. Comparar a expressão e os níveis de metilação dos genes *DPYSL2*, *CNP*, *HSPA8* e *HSPA9* entre córtex entorrinal, córtex auditivo e hipocampo, de idosos saudáveis e de pacientes com DA.

4. Quantificar e comparar a porcentagem de metilação de sequências LINE1 em tecido cerebral *post mortem* (córtices entorrinal e auditivo e hipocampo) entre idosos saudáveis e pacientes com DA.

5. Quantificar e comparar a porcentagem de metilação de sequências LINE1 entre córtex entorrinal, córtex auditivo e hipocampo, de idosos saudáveis e de pacientes com DA.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Envelhecimento

O envelhecimento é um processo multifatorial, complexo e irreversível. Suas características mais proeminentes são a diminuição progressiva na capacidade fisiológica, a capacidade reduzida de responder adaptativamente aos estímulos do meio ambiente, o aumento da suscetibilidade a doenças e o aumento na mortalidade (13). O processo de envelhecimento é caracterizado por uma série de alterações no organismo, entre elas o estresse oxidativo, as alterações na homeostase do cálcio, a instabilidade cromossômica, as alterações nos mecanismos de reparo do DNA e o acúmulo de danos no DNA mitocondrial e nuclear (3).

Projeções indicam que deverá haver cerca de dois bilhões de habitantes com 60 anos ou mais em 2050 (2). No Brasil, dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística de 2009 (14) indicam que o grupo etário de 60 anos ou mais duplicará no período de 2000 a 2020, passando de 13,9 para 28,3 milhões, e, posteriormente, elevando-se para 64 milhões em 2050. De acordo com essas projeções, em 2030, o número de idosos irá superar em quase quatro milhões a faixa etária que possui idade abaixo de 15 anos, e essa diferença aumentará para 35,8 milhões em 2050 (Figura 1).

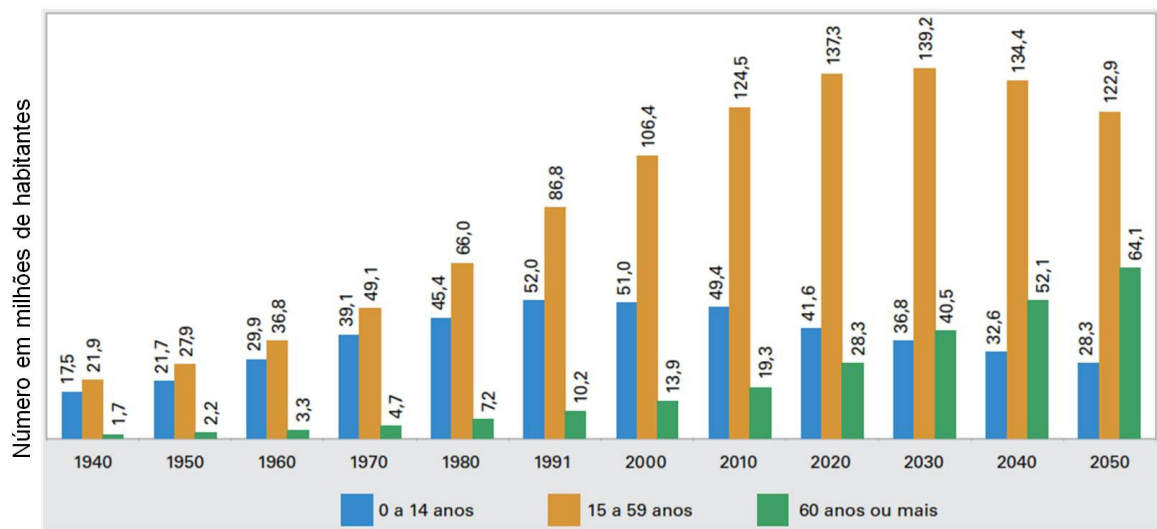


Figura 1: População (em milhões de habitantes) de crianças (0 a 14 anos), jovens e adultos (15 a 59 anos) e idosos (60 anos ou mais) estimada para o período de 1940 a 2050 no Brasil. Adaptado de Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2009.

O aumento da expectativa de vida resultou em um significativo crescimento da população idosa mundial, o que acarretou no aumento da incidência de doenças associadas ao envelhecimento, como, por exemplo, demências e doenças vasculares e osteoarticulares (15).

A demência é uma condição neurológica que resulta no declínio de múltiplos domínios cognitivos e é acompanhada de perda funcional, levando à perda da independência e à incapacidade de desempenhar atividades da vida diária (16).

Nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, a expectativa de vida aumenta a cada ano. Como o maior fator de risco para o desenvolvimento de demências é o envelhecimento, o número de pessoas com demências no mundo tende a dobrar nos próximos 20 anos de acordo com o *World Alzheimer Report 2010* (Figura 2) (1).

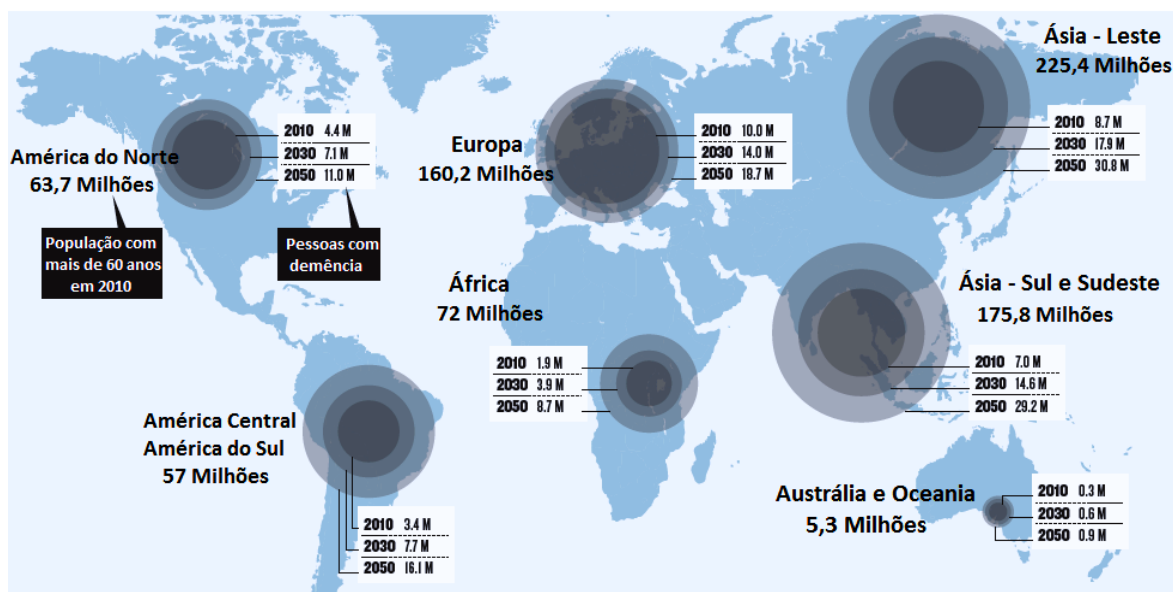


Figura 2: Estimativa global da incidência de demência para as próximas décadas. M: milhões. Fonte: Modificado de Abbott 2011.

Em 2010, o impacto econômico da demência no mundo foi de US\$ 604 bilhões, superando os custos pessoais com neoplasias ou doenças cardíacas. Entretanto, o montante em verbas públicas direcionado ao tratamento de demências é consideravelmente menor do que o destinado ao tratamento dessas outras doenças (1).

A DA é o tipo mais comum de demência, representando 60-80% de todos os casos. O envelhecimento é o principal fator de risco para esse distúrbio (17).

2.2 Doença de Alzheimer

2.2.1 Características Gerais

A DA é uma afecção neurodegenerativa, progressiva, irreversível, que lesa gradativamente os neurônios do córtex cerebral, com conseqüente deterioração progressiva da memória (17).

A DA é a uma das doenças mais comuns no mundo industrializado afetando 6% da população com mais de 65 anos (3, 5). A prevalência da DA aumenta para 19% após os 75 anos e para 30% após os 85 anos (18). Em 2006, existiam 26,6 milhões de casos da DA em todo o mundo. Estima-se que em 2050 a prevalência de DA seja de mais de 106 milhões de indivíduos afetados (5). A herdabilidade da DA (susceptibilidade na população devido a variações genéticas) é estimada em 60 a 80% (19).

No Brasil, apenas dois estudos investigaram a prevalência e incidência de demência na população. A prevalência de DA foi de 7,1% em população com 65 anos ou mais (20) e a incidência foi de 7,7 afetados a cada 1000 pessoas por ano (21). Em termos de saúde pública, nas próximas décadas o Brasil precisará desenvolver políticas precisas para lidar com o envelhecimento da população e com aumento da demência e transtornos comórbidos (22).

A DA é uma doença multifatorial e geneticamente complexa. Muitos fatores podem influenciar no risco de desenvolvimento, modificar a idade de acometimento e o curso da doença (17).

Fatores ambientais relacionados o aumento do risco de DA incluem exposição a metais (ferro, zinco, mercúrio, cobre e alumínio), pesticidas, deficiências na dieta, trauma cerebral e infecções (3). A diminuição do risco está

associada a fatores relacionados à dieta, como ingestão de frutas, vegetais, antioxidantes, restrição de calorias e atividade física (23).

Alguns fatores sociais também podem estar associados ao acometimento pela DA: indivíduos entre 40 e 60 anos de idade que não possuem um companheiro apresentam maior risco de desenvolver a DA, sendo que, pessoas viúvas ou divorciadas neste período apresentam três vezes mais chances de acometimento (24).

Outro fator que aparentemente desempenha um papel importante no processo de neurodegeneração é a oxidação de proteínas, pois o dano oxidativo leva à perda de função das proteínas modificadas. Além disso, a oxidação protéica pode afetar o crescimento e a diferenciação celular (25).

2.2.2 Aspectos clínicos e neuropatológicos

Existem evidências de que os mecanismos patogênicos da DA se manifestam no início da doença, em um período de pródromo considerado bastante longo (5-20 anos). Esse período inclui o comprometimento cognitivo leve que precede o acometimento da demência (26).

Foram descritos três estágios para a DA – leve, moderado e grave – com declínios funcional e cognitivo que duram de 5 a 8 anos e tendem a ser lineares durante os três estágios da doença. No estágio inicial (leve), que normalmente dura de 2 a 3 anos, o paciente apresenta prejuízo na memória de curto prazo que é frequentemente acompanhado por sintomas de ansiedade e depressão. Durante o estágio moderado, ocorrem manifestações neuropsiquiátricas como alucinações visuais, crenças falsas e alteração no padrão de sono. O estágio final, mais grave é caracterizado por sinais motores como rigidez, declínio cognitivo proeminente e vida puramente vegetativa (27).

As duas maiores características neuropatológicas da DA são a presença de placas senis e de novelos neurofibrilares (Figura 3) (4). As placas senis são compostas por depósitos de peptídeos β -amilóide (β A) extracelulares. A proteína β A é formada a partir da clivagem da proteína precursora amilóide (APP) por meio das enzimas β e γ secretases (5). A APP é uma proteína

transmembrânica e a sua clivagem fisiológica resulta na secreção de um domínio extracelular (28).

Dentre os produtos finais da clivagem de APP encontram-se as variantes do peptídeo β A que tendem a se agregar (28). As γ secretases, em particular, parecem ser responsáveis por gerar o peptídeo β A₄₂, que forma fibras insolúveis que se acumulam nas placas senis em cérebro de pacientes com DA (29). Essas placas são tóxicas para a membrana celular e iniciam um processo inflamatório de células gliais, causando danos aos neurônios (28).

Osovelos neurofibrilares são depósitos intracelulares de proteína tau hiperfosforilada. A proteína tau, associada aos microtúbulos, desempenha papel no transporte axonal e outras funções. Além das placas senis eovelos neurofibrilares, a DA é caracterizada por degeneração neurítica e sináptica, e morte neuronal (30).

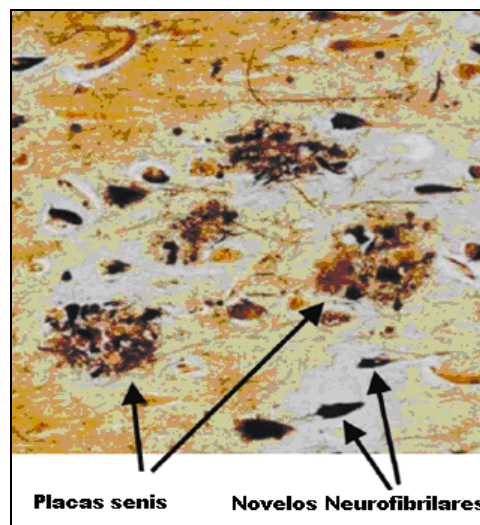


Figura 3: Placas senis eovelos neurofibrilares observados no córtex cerebral de paciente com a Doença de Alzheimer. Fonte: Modificado Blennow et al, 2006.

A hipótese da cascata amilóide sintetiza dados histopatológicos e genéticos e postula que a deposição de β A no tecido cerebral inicia uma cascata de eventos que levam à DA (31). Já a fosforilação anormal da tau na DA induz à diminuição da capacidade dessa proteína na polimerização da tubulina e na ligação à microtúbulos. Esses eventos induzem a instabilidade dos microtúbulos e, conseqüentemente, a morte celular e a neurodegeneração (30).

Embora a hipótese da cascata amilóide e da hiperfosforilação da tau estejam mais frequentemente descritas na DA, a apoptose, a perda sináptica e as alterações neuronais devem também atuar concomitantemente na patofisiologia da doença (32, 33).

O lobo temporal medial é a principal região afetada na DA (34). No lobo temporal medial e em regiões que se conectam, ocorre uma acentuada atrofia de populações neuronais com conseqüente aumento dos espaços ventriculares e desgaste dos giros cerebrais. Essa região também apresenta maior densidade de placas senis e novos neurofibrilares (35).

A taxa de atrofia no hipocampo varia entre 3 e 7% ao ano em pacientes com DA, enquanto que em controles saudáveis é de no máximo 0,9% (36). Sugere-se que o córtex entorrinal seja alvo precoce da DA e pode ser a região por onde a doença se dissemina para outras áreas cerebrais, propagando-se por meio do circuito entorrinal-hipocampal. Uma vez que as várias formas de memória dependem dessas vias intactas, é esperado que elas estejam gravemente afetadas na DA (37).

Os emaranhados neurofibrilares são encontrados primeiramente no córtex entorrinal de pacientes com DA leve e distribuem-se para o hipocampo e outras áreas corticais durante a progressão da doença. Seis estágios são descritos de acordo com a gravidade da doença (estágios Braak). O estágio transentorrinal I e II caracteriza os casos clinicamente silenciosos, o estágio límbico III e IV caracteriza o início clínico da doença e o estágio neocortical V e VI caracteriza a doença avançada.

O aumento da produção de β A/APP em modelos transgênicos de camundongos que superexpressam uma forma mutante de *APP* no córtex entorrinal, resultou em alterações cognitivas e comportamentais, incluindo hiperatividade, desinibição e déficits no aprendizado e na memória. No mesmo sentido, esses animais apresentaram deficiência na transmissão sináptica que pode ser responsável por iniciar as disfunções observadas nas vias córtico-hipocampais tanto em modelos animais quanto em pacientes com DA (37).

2.2.3 Aspectos Genéticos

Geneticamente a DA é heterogênea e complexa, e apresenta diferentes formas de herança. A DA de acometimento precoce (antes dos 60-65 anos) possui herança autossômica dominante e está associada a mutações em três genes relacionados à produção e à eliminação da βA (5). Por outro lado, a DA de acometimento tardio, ou esporádico, apresenta herança complexa, com influencia tanto de fatores genéticos quanto ambientais (7).

Diferentes mutações nos genes *APP*, *PSEN1* e *PSEN2* estão descritas nos casos familiares de DA (Tabela 1) e explicam 30-50% dos casos de herança autossômica dominante. A descoberta dessas mutações reforça a hipótese da cascata amilóide na doença, pois os três genes afetam a mesma via: *PSEN1* e *PSEN2* codificam componentes do complexo de γ -secretase, responsável pela clivagem de APP (7). Mutações nesses três genes causam a clivagem anormal de APP e aumentam a produção de βA_{42} , amiloidogênico e tóxico, em relação à forma menos tóxica βA_{40} (29, 38).

A DA do tipo esporádico é responsável pela maioria dos casos da doença. Diversos fatores de risco parecem influenciar no desenvolvimento da DA esporádica e estudos de associação caso-controle são amplamente utilizados para identificar tais fatores. Em 1993, Corder e colaboradores descreveram um polimorfismo no gene *APOE*, que codifica a Apolipoproteína E, que possui importante papel na regulação do metabolismo do colesterol e triglicérides e está intimamente associada à forma esporádica da DA (39) (Tabela 1).

O alelo $\epsilon 4$ de *APOE* é o fator de risco para DA esporádica mais consistentemente replicado e com *odds ratio* de 3.97(3). Entretanto apenas 50% dos casos de Alzheimer de acometimento tardio apresentam *APOE $\epsilon 4$* , o que indica a participação de outros genes neste tipo de herança (7).

Tabela 1: Genes envolvidos no desenvolvimento da Doença de Alzheimer, localização cromossômica, valores de risco relativo e respectivas referências.

Tipo de Herança	Gene	Cromossomo	Odds Ratio	Referências
Doença de Alzheimer Familiar	<i>APP</i>	21q21.2		(40)
	<i>PSEN1</i>	14q24.3		(41),(42)
	<i>PSEN2</i>	1q31-q42		(43)
Doença de Alzheimer Esporádica	<i>APOEϵ4</i>	19q13.2	3,97	(39)
	<i>CLU</i>	8p21-912	0,85	(44, 45)
	<i>PICALM</i>	11q14	0,87	(44)
	<i>CR1</i>	1q32	1,18	(46)
	<i>MTHFD1L</i>	6q25.1		(47)
	<i>TNK1</i>	17p13.1	0,86	(48)
	<i>ACE</i>	17q23.3	0,83	(49)
	<i>TFAM</i>	10q21.1	0,82	(50)
	<i>CST3</i>	20p11.21	1,13	(51)
	<i>SORL1</i>	11q23.2-q24.2	1,21	(52)
	<i>CHRNA2</i>	1q21.3	0,67	(53)
<i>SORCS1</i>	10q23-q25	1,24	(54)	

Nos últimos anos, estudos *Genome Wide-Association* (análise do genoma total) revelaram poucos *loci* associados à DA, sendo que, novos genes (*CLU*, *CR1* e *PICALM*) (Tabela 1) devem contribuir com uma proporção pequena no risco de acometimento da doença (55). Uma variante de gene *CLU* (rs113600), que codifica uma lipoproteína importante no cérebro, foi descrita como um fator protetor para a DA. Também foi descrito que uma variante do gene *PICALM* (rs3851179), que codifica uma proteína associada a alterações sinápticas, pode ser um fator protetor para a doença. O gene *CR1* codifica o receptor do complemento C3b que provavelmente atua na eliminação de β A e configura-se como um fator de risco para o desenvolvimento da DA (rs6656401) (3).

2.3 Epigenética

A epigenética é definida como alterações herdadas da expressão gênica que não resultaram de modificações na sequência de DNA. Eventos epigenéticos atuam no desenvolvimento e na diferenciação celular, permitindo que as células com o genoma idêntico possam apresentar fenótipos distintos (35).

As alterações epigenéticas incluem três mecanismos moleculares que interagem entre si: metilação do DNA, modificações de histonas e regulação da expressão gênica mediada por RNAs (56).

A metilação de citosinas é a modificação epigenética predominante em mamíferos (Figura 4). As DNA metiltransferases (DNMTs) são as principais responsáveis por essa modificação epigenética. DNMT1 é uma metiltransferase de manutenção, que replica padrões de metilação. DNMT3a e DNMT3b promovem a metilação *de novo* no DNA. Essa modificação não altera a sequência do DNA, mas determina em qual tecido e quando um gene deverá ser expresso (57).

A metilação do DNA é um processo normal que ocorre em mamíferos no desenvolvimento de células embrionárias, na inativação do cromossomo X em mulheres e na repressão de elementos de transposição (12). O padrão de metilação do DNA é estabelecido no início do desenvolvimento e se mantém durante a diferenciação, com algumas modulações na metilação de promotores de genes tecido-específicos (57).

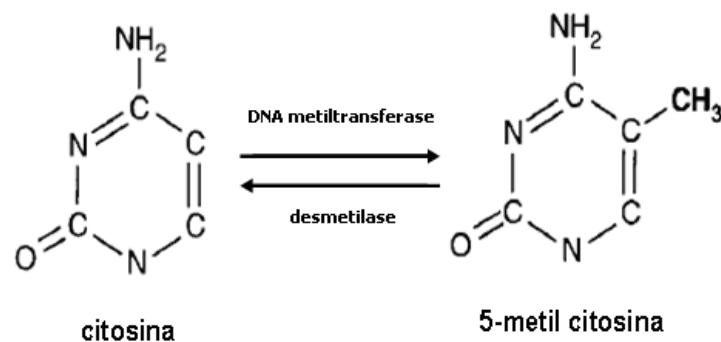


Figura 4: Adição de um grupo metil ao carbono 5' do anel pirimídico de uma citosina por ação de uma DNA metiltransferase. Fonte: Modificado de Baylin, 2005.

A metilação do DNA ocorre no carbono 5' de citosinas que precedem guaninas, normalmente localizadas em ilhas CpGs. As ilhas CpGs são definidas como regiões do DNA com 200 pb ou mais, nas quais a quantidade de GC é maior que 60% (35). Aproximadamente metade dos promotores gênicos humanos contém ilhas CpGs (12).

Genes ativamente transcritos geralmente apresentam CpGs não metilados na região promotora, enquanto que, genes silenciados possuem abundante metilação nessa região (12).

A metilação de ilhas CpGs é normalmente acompanhada de modificações pós-traducionais de histonas, que em conjunto, atuam na regulação da expressão gênica (58). A metilação do DNA atua impedindo a ligação de fatores de transcrição e da maquinaria de transcrição por meio da atração de proteínas, *Methyl-binding Domain* (MBD) e outras moléculas que alteram a conformação da cromatina (Figura 5). A família MDB apresenta um domínio de ligação específico ao DNA contendo sítios CpG metilados e age como repressora, recrutando histonas desacetilases (HDACs), histonas metiltransferases (HMTs) e proteínas de heterocromatina (35). Dessa forma, a cromatina silenciada é rica em histonas metiladas e desacetiladas (56).

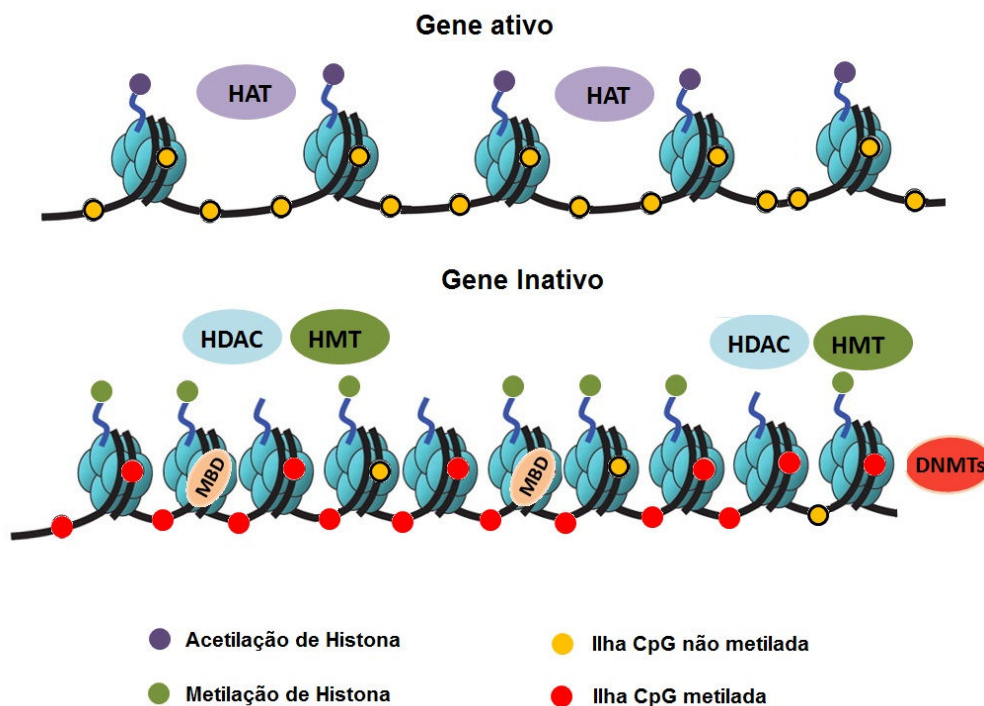


Figura 5: Silenciamento da transcrição gênica pela ação de eventos epigenéticos em ilhas CpGs do DNA. O gene ativo apresenta baixa metilação do DNA e alta acetilação de histonas. O gene inativo apresenta aumento da metilação do DNA, desacetilação de histonas e metilação de histonas. HAT: histona acetiltransferase; HDAC: histona desacetilase; HMT: Histona metiltransferase; MBDs: proteínas de ligação a metilcitosinas, DNMTs: DNA metiltransferase.

Cabe ressaltar que a regulação da transcrição por meio da metilação não ocorre apenas em ilhas CpGs, mas também em regiões recentemente descritas como *CpG shores*, sendo estas regiões supostamente responsáveis pela maior parte da metilação tecido específica (59). Além disso, a metilação do DNA localizada dentro dos éxons pode ter um papel na ativação transcricional, prevenindo o início da transcrição (60).

Acredita-se que modificações de histonas e a metilação de DNA estejam envolvidas no espectro variável de doenças humanas como o câncer e outras doenças crônicas complexas (55).

2.4 Expressão gênica como ferramenta para descoberta de biomarcadores

O diagnóstico atual da DA é inicialmente baseado em exclusão, no qual a possibilidade de outras demências é descartada e a ocorrência da doença continua viável. Infelizmente, os testes para o diagnóstico de DA não são totalmente otimizados. Mesmo com validações internacionais, muitos fatores aumentam a variabilidade e limitam a reprodutibilidade da avaliação clínica (61). Além disso, o diagnóstico clínico é, geralmente, realizado após o surgimento dos sintomas cognitivos e significativa neurodegeneração (62).

O diagnóstico preciso da DA, definitivo “padrão-ouro”, pode somente ser determinado por análises neuropatológicas do cérebro *post mortem* (62).

Atualmente, é constante a busca por marcadores biológicos que possam prever se um indivíduo irá desenvolver a DA, ou, em qual estágio da doença ele se encontra. Um marcador como esse, seria capaz de auxiliar na conduta clínica e pode ser alvo para novas drogas que busquem a diminuição do declínio cognitivo (8). Adicionalmente, a identificação de biomarcadores que possam prever a conversão do comprometimento cognitivo leve (*mild cognitive impairment* - MCI) para a DA também é de grande importância, pois auxiliariam na conduta de pacientes com DA precoce (63).

Marcadores biológicos – biomarcadores – são indicadores biológicos de doença ou de efeitos terapêuticos, que podem ser dosados por

meio de testes no sangue, de outras amostras biológicas ou por meio de testes de imagem (64).

Flúidos corporais, como sangue, urina, saliva e líquido cefalorraquidiano têm sido utilizados na descoberta de biomarcadores de expressão gênica para doenças neurológicas. Essas análises estão baseadas na premissa de que fluídos biológicos e células não-neuronais podem servir como substratos de processos patobiológicos e farmacológicos no cérebro (64).

O sangue é um fluido biológico amplamente utilizado em testes diagnósticos, por ser um método não invasivo e a amostra ser disponível facilmente para coleta. Além disso, análises do sangue periférico podem ser processadas em laboratórios comuns, com infra-estrutura menos especializada quando comparada a análises de imagem (65).

Para uma detecção precoce ideal dos diferentes tipos de demência, buscam-se testes diagnósticos pouco invasivos e acessíveis. A estrutura da barreira hematoencefálica limita a presença de biomarcadores periféricos que possam estar associados a patologias cerebrais tais como moléculas pequenas, lipofílicas e que dependem de transportadores específicos. Uma alternativa é a análise do perfil transcricional de genes no tecido sanguíneo periférico, que é capaz de indicar mudanças mais precocemente do que alterações protéicas (66).

Para explicar como um transcrito do sangue pode agir como marcador de uma doença cerebral, é hipotetizado que a doença envolve diversos processos que resultam em alterações sistêmicas da expressão gênica, e que, dessa forma, poderiam ser detectadas no sangue, embora a manifestação da disfunção ocorra somente no cérebro (67). Adicionalmente, a análise de expressão gênica no sangue de pacientes com DA pode ser considerada adequada para a descoberta de biomarcadores devido à elevada sensibilidade do método e da grande quantidade de informação produzida com apenas uma amostra (65).

O perfil de expressão de células mononucleares de sangue fresco pode oferecer vantagens na identificação de biomarcadores, pois o Sistema

Nervoso Central (SNC) se comunica com o sistema imune por meio de múltiplos mecanismos moleculares, hormonais e de neurotransmissão. O padrão anormal de expressão da APP, níveis alterados de enzimas antioxidantes, danos oxidativos ao DNA e RNA e níveis aumentados de apoptose também são características compartilhadas entre o SNC e as células do sangue utilizadas em diagnósticos de doenças neurodegenerativas (68);(69).

Dessa forma, alguns estudos da literatura buscaram previamente acessar o perfil transcricional de sangue periférico de pacientes com DA e de controles saudáveis, com a finalidade de investigar diferenças na expressão gênica e de identificar novos marcadores para a doença (70).

2.5 Metilação do DNA no envelhecimento e na DA

Diversos estudos demonstraram que o envelhecimento também está associado a alterações epigenéticas. Foi previamente descrito o padrão de metilação do DNA e de acetilação de histonas é diferente entre gêmeos monozigóticos em idade mais avançada, enquanto que, no início da vida, essas marcas epigenéticas eram indistinguíveis entre os indivíduos (71).

A hipometilação do DNA no envelhecimento tem sido associada a uma ineficiência da DNMT1 em manter a metilação da heterocromatina (72). O envelhecimento pode ainda afetar diferentemente as diversas regiões do genoma. Sequências repetitivas *Alu* são alvo de hipometilação relacionada à idade, enquanto que, as sequências *LINE1* não sofrem hipometilação (73). Ilhas CpGs localizadas nos promotores gênicos tendem a sofrer hipermetilação no envelhecimento, enquanto que regiões fora das ilhas apresentam maior hipometilação (74).

Na DA, a perda do controle preciso sobre a metilação gênica pode alterar o delicado equilíbrio entre as secretases (β e γ). Foi demonstrado que a regulação por metilação dos genes das enzimas β e γ secretases, responsáveis pelo processamento de β A, levaram ao acúmulo dessa proteína (75).

Além de alterações nas enzimas que processam APP, foi descrito um padrão de metilação aberrante no gene *APP* em pacientes com DA quando comparados a indivíduos controles (76).

Ao nosso conhecimento, nenhum estudo avaliou o perfil de metilação do gene *APOE* na DA. Wang e colaboradores (2008) relataram a presença de CpGs em indivíduos com alelo $\epsilon 4$, que não existiam em portadores dos alelos $\epsilon 2$ e $\epsilon 3$ (77). Como nem todos os portadores do alelo $\epsilon 4$ desenvolvem a doença, seria interessante avaliar comparativamente a metilação entre portadores do alelo $\epsilon 4$ afetados e não afetados pela DA (78).

Genes que participam de vias inflamatórias, de apoptose e ciclo celular aberrante apresentam influência do mecanismo de metilação que podem estar relacionadas à patofisiologia da DA (78). Estudos do nosso grupo demonstraram alteração no perfil de metilação do gene *HTERT* em sangue periférico de pacientes com DA (79).

Outro indício da participação do processo de metilação na DA é a alteração nos níveis de moléculas como homocisteína (que participam do ciclo de transmetilação) comumente observado na doença. A metilação de citosinas por DNMTs requer S-adenosil-metionina (SAM) como doador de grupos metil. O ciclo de transmetilação ocorre pela desmetilação de SAM, formando S-adenosil-homocisteína (SAH), que é posteriormente hidrolisada em homocisteína (HYC). HYC é convertida em metionina pela transferência de um grupo metil da enzima 5-metil-tetrahidrofolato (5-MTHF) em um processo que requer vitamina B12 e ácido fólico. O ciclo é completado pela conversão da metionina e ATP em SAM (Figura 6) (80).

Dieta e níveis de homocisteína estão provavelmente relacionados a alterações no padrão de metilação na DA (81). Diversos estudos propõem interações entre a diminuição dos níveis de folato e homocisteína e alterações no padrão de metilação e expressão de genes relacionados à doença (7).

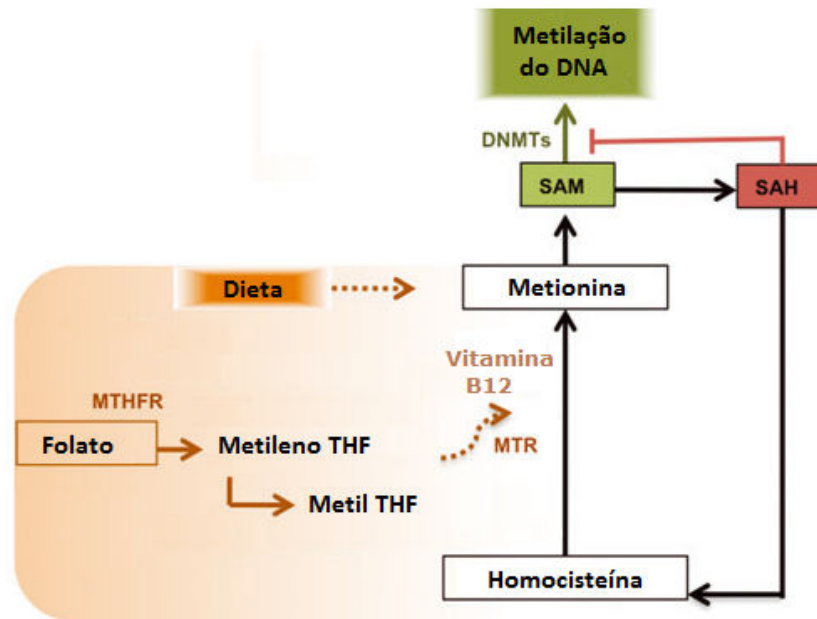


Figura 6: Ciclo de transmetilação. A metionina é convertida em S-adenosil-metionina (SAM), que posteriormente doa um grupo metil para diversos componentes bioquímicos. Me: Grupo Metil, MTHFR: Metileno-tetrahydrofolato redutase, THF: Tetrahydrofolato, DNMTs: DNA metil transferase, SAM: S-adenosil-metionina, SAH: S-adenosil-homocisteína. MTR: 5-metil-tetrahydrofolato-homocisteína S-metiltransferase. Fonte: Modificado de Iraola-Guzmán 2010.

Linnebank e colaboradores relataram a diminuição significativa de SAM no fluido cerebrospinal de pacientes com DA em relação a idosos controles, e essa diminuição foi correlacionada à presença de *APOEε4* (82).

Os níveis de SAM, assim como os de folato e de vitamina B12, estão frequentemente reduzidos na DA, enquanto que a homocisteína plasmática apresenta-se aumentada (83). A hiperhomocisteinemia pode aumentar os níveis de SAH, que inibe a atuação de DNMTs e podem ser marcadores da progressão da DA e do declínio cognitivo (81).

O epigenoma normal do cérebro humano e as alterações que originam doenças ainda não estão bem compreendidos (35). A metilação no tecido cerebral apresenta um padrão dinâmico. Estudos de Ladd-Acosta e colaboradores (2007) relataram a presença de metilação específica para cada região cerebral, sendo que, a metilação dos neurônios também varia ao longo da vida. Adicionalmente, os perfis de metilação de uma mesma área cerebral de indivíduos diferentes, apresentam similaridades e podem ser agrupados. Dessa

forma é mais importante a origem neuroanatômica do que as diferenças epigenéticas individuais (84).

Ao contrário das ilhas CpG, as regiões de DNA repetitivo são intensamente metiladas em tecidos somáticos. Durante o envelhecimento foi relatada uma hipometilação global do DNA genômico (85).

2.6 Metilação e implicações terapêuticas em DA

Ao contrário das mutações no DNA, as alterações epigenéticas são potencialmente reversíveis e podem ser consideradas um alvo para tratamentos farmacológicos (55). Vários trabalhos têm demonstrado a reexpressão de genes que são silenciados por metilação, por meio de agentes desmetilantes, como, por exemplo, 5-aza-2-deoxicitidina, 5-azacitidina e zebularina (86).

As drogas epigenéticas atuais agem sobre alvos globais e reconhecem marcas epigenéticas específicas. Entretanto, as doenças complexas apresentam uma série de alterações genéticas e epigenéticas. Atuando de forma global, as drogas epigenéticas podem apresentar benefícios terapêuticos, porém ainda é necessária uma melhor compreensão das alterações epigenéticas que ocorrem em cada doença para o desenvolvimento de terapias mais eficientes e específicas e com menores efeitos colaterais (87).

Atualmente, existem duas classes principais de tratamentos epigenéticos: Inibidores de DNMTs e HDACs (87). Durante a última década, um número elevado de drogas com alvo na metilação do DNA foram desenvolvidas, com intuito de aumentar a eficácia e diminuir a toxicidade das drogas utilizadas.

A atividade desmetilante da 5-Azacitidina em células tumorais foi descoberta em 1980. A 5-Azacitidina é uma inibidora de DNMTs aprovada pelo FDA (*Food and Drug Administration*), e inicialmente foi sintetizada como um agente citotóxico (88). Essa droga é atualmente recomendada para o tratamento de síndromes mielodisplásicas (88). Na DA, Payão e colaboradores (1989) observaram maior desespiralização cromossômica de heterocromatina constitutiva do que em idosos controles em resposta ao tratamento com 5-azacitidina (89).

Na DA, a administração *in vitro* de SAM em meio deficiente de doadores de metil restabeleceu a expressão gênica de *PSEN1* e β secretases e reduziu os níveis de β A (11). Dada a provável influência da metilação do DNA na doença, a modulação da metilação gênica deve ser um alvo para a prevenção e o controle da progressão da DA (90).

2.7 Genes e sequências de DNA selecionados para o presente estudo

Foram selecionados para o presente estudo, genes candidatos e sequências de DNA repetitivo *LINE1*. Os genes candidatos *DPYSL2*, *CNP*, *HSPA8* e *HSPA9*, estão relacionados principalmente a funções como transdução e modulação de sinais, apoptose, desenvolvimento e diferenciação do SNC, mielinização, dobramento e eliminação de proteínas. Estes genes foram selecionados com base em relatos de alterações dos níveis protéicos em pacientes com DA (91) e na presença de ilhas CpGs em seus promotores. A seguir, pode-se encontrar uma breve descrição dos genes investigados e das sequências repetitivas *LINE1*.

2.7.1 *DPYSL2 (Dihydropyrimidinase-like 2)*

O gene *DPYSL2* está localizado no cromossomo 8p21.2, e seu produto proteico é envolvido na regulação da formação de axônios durante a polarização neuronal (92). A proteína *DPYSL2* é membro de uma família de proteínas relacionadas à di-hidropirimidinase que estão implicadas no processo de desenvolvimento do SNC em mamíferos, aves e anfíbios (93).

DPYSL2 (também chamada *DRP-2* e *CRMP-2*) é uma proteína citosólica abundante no sistema nervoso, envolvida no crescimento axonal e na sinalização de vias por meio da transmissão e modulação de sinais extracelulares (93).

A superexpressão do gene *DPYSL2* induz a formação de múltiplos axônios e pode converter um dendrito estabelecido em um axônio (94). *DPYSL2*

interage com heterodímeros de tubulina e promove a montagem de microtúbulos *in vitro*, promovendo o alongamento de axônios (92).

A perda ou diminuição de DPYSL2 pode inibir na formação de axônios e resultar em anormalidades no neurodesenvolvimento (92). Em relação à expressão de DPYSL2, os relatos da literatura são conflitantes. Johnston e colaboradores (2000) reportaram uma diminuição proteica de DPYSL2 em cortex frontal de pacientes com esquizofrenia, doença bipolar e depressão maior. Por outro lado, Edgar e colaboradores (2000) demonstraram o aumento de expressão de DPYSL2 em hipocampo de pacientes com esquizofrenia (95, 96).

Em cérebro de portadores de Síndrome de Down (SD), os níveis de DPYSL2 apresentam-se diminuídos, sugerindo um papel na sinaptogênese e na diferenciação neuronal anormal que é observada na doença. A diminuição da expressão protéica corrobora em parte os estudos que relataram a diminuição dos níveis de RNAm em diferentes regiões do cérebro (97).

Castegna e colaboradores (2002) relataram o aumento da oxidação da proteína DPYSL2 em pacientes com DA quando comparados aos indivíduos controles, o que pode levar a uma diminuição dos mecanismos de formação de redes neurais na DA após perda neuronal na doença (25, 98).

Além disso, estudos relataram a atuação DPYSL2 na regulação da dinâmica de microtúbulos e novos neurofibrilares (99), e descreveram DPYSL2 como um possível biomarcador para DA (91).

2.7.2 CNP (2',3'-Cyclic Nucleotide 3' Phosphodiesterase)

A proteína CNP, codificada pelo gene *CNP*, localizado no cromossomo 17q12.2, é um marcador de oligodendrócitos que representa 4% das proteínas que compõem a mielina. Essa molécula está localizada na bainha dos axônios e nas alças paranodais de mielina. Embora a função de CNP não esteja bem esclarecida, a proteína deve desempenhar uma função catalítica e estrutural, uma vez que se liga a três moléculas de GTP e, quando superexpressa, produz mielinização aberrante (100).

Na DA, assim como na SD, alterações na oligodendroglia e mielina já foram relatadas em diferentes estudos(101). É proposto que a oligodendroglia, a principal célula formadora de mielina no SNC, esteja afetada em ambas as doenças e que marcadores como a proteína CNP, cerebrosídeos e proteínas mielínicas apresentem atividade diminuída nessas doenças (102).

Estudos de Vlkolinsky e colaboradores (2001) demonstraram um decréscimo significativo da atividade da CNP na região do córtex frontal de pacientes com DA e uma tendência ao decréscimo também nas regiões de córtex parietal e temporal (101). Esses achados corroboram a diminuição da mielinização encontrada na doença e descrita anteriormente por métodos histológicos, sugerindo que as alterações nos níveis de CNP encontrados nos pacientes com DA resultem na perda da função sináptica, declínio cognitivo e morte neuronal.

Reinikainen e colaboradores (1989) observaram o aumento da expressão da proteína CNP em córtex temporal e parietal, e a diminuição dessa proteína no hipocampo e no putâmen em pacientes com DA em relação a idosos controles. Os autores sugerem uma resposta compensatória promovendo o aumento da expressão do gene nas regiões corticais, e uma perda de mielina juntamente com os neurônios na região do hipocampo (102).

Foi observada diminuição de 17% da proteína CNP na substância branca de indivíduos com DA quando comparados a idosos controles. Quando considerado o estágio Braak da doença nos tecidos, foi observada diminuição em 17% do grupo com Braak VI em relação ao grupo Braak I e II (100).

Na DA, é possível que as alterações nos níveis de CNP resultem na perda da função sináptica, declínio cognitivo e morte neuronal observadas nos pacientes.

2.7.3 HSPA8 (Heat Shock 70kDa Protein 8) HSPA9 (Heat Shock 70kDa Protein 9)

As chaperonas (ou *Heat Shock Proteins* - HSPs) são proteínas evolutivamente conservadas e desempenham um papel citoprotetor fundamental para a sobrevivência das células (103).

A evolução da maioria dos organismos depende da atuação das HSPs, que promovem a adaptação e sobrevivência celular sob condições de estresse. As células respondem ao estresse aumentando a expressão de HSPs, que são capazes de reverter o dobramento errôneo de proteínas (104).

As chaperonas da família HSPAs (também chamadas HSP70) atuam no dobramento, montagem, transporte e segmentação de proteínas. O genoma humano contém 13 genes de HSPAs, dos quais 12 são codificantes de proteínas distintas. Os genes *HSPA5*, *HSPA8* e *HSPA9* são expressos constitutivamente, estando presente no retículo endoplasmático, citosol e mitocôndrias, respectivamente (104).

As HSPAs encontram-se superexpressas em tumores e têm papel essencial na sobrevivência das células tumorais. As HSPAs neutralizam as mudanças conformacionais das proteínas alteradas, comuns em células tumorais (104).

As HSPs estão envolvidas nas mudanças conformacionais em proteínas do cérebro por meio do dobramento e agrupamento em estruturas oligoméricas (105). Estudos de Muchowski e colaboradores (2005) apontaram as chaperonas como supressoras eficientes em doenças neurodegenerativas (106).

Na DA, a atividade biológica da β A é correlacionada ao seu estado conformacional que, quando alterado, induz um agrupamento anormal de fibrilas e um concomitante efeito tóxico em neurônios. Estudos de proteômica demonstraram que diversas HSP apresentam expressão alterada no cérebro de pacientes com a DA, incluindo a expressão reduzida de HSPA8 e HSPA9 (105).

O produto proteico do gene HSPA8, localizado no cromossomo 11q24.1, é a proteína HSPA8 ou HSC70, uma HSP constitutiva (107). Essa

proteína pode estar envolvida na manutenção dos proteossomos e no reconhecimento conformacional de proteínas com dobramento errôneo, pelas proteases. A atividade diminuída da HSPA8, que é atribuída tanto à expressão reduzida quanto ao aumento de modificações oxidativas, pode ser a responsável por prejudicar o processo de remoção de proteínas danificadas e, conseqüentemente, pelo acúmulo de β A no cérebro (91).

Estudos com linhagens celulares HeLa que superexpressavam tau demonstraram que inibidores de HSPA8 induziram um aumento rápido na ubiquitinação de tau e na degradação dependente de proteossomos (108). As HSPAs participam da remoção de novos neurofibrilares por meio de um mecanismo ainda pouco esclarecido (109). A atividade de remoção de novos neurofibrilares por meio de inibição de HSPAs pode ser uma terapia promissora para a DA (104).

A proteína HSPA9 (também chamada GRP75 ou Mortalina) é um membro da família de proteínas HSP70. Diferentemente de outros membros da família HSP70, a HSPA9 não é induzida por calor, mas já foi relatada sua capacidade de responder a outras formas de estresse, como, por exemplo, privação de glicose, danos oxidativos, drogas e raios UVA. Estudos relataram que as proteínas HSPA9 são armazenadas principalmente nas mitocôndrias, mas muitas evidências demonstraram a presença dessas proteínas em outros compartimentos celulares, como retículo endoplasmático e citosol (110).

Considerando-se que a expressão diminuída ou a perda da expressão das chaperonas da família HSP70 resultava em apoptose. Mosser e colaboradores (1997) estudaram o papel das HSP70 no bloqueio do processo de apoptose e demonstraram uma diminuição na ativação das cascatas de caspases e na sinalização em vias de quinases (111). Esses estudos indicaram que a perda da expressão de HSPA8 e HSPA9 deve desempenhar um papel crítico na morte neuronal associada à DA (105).

2.7.4 LINE1 (Long Interspersed Nuclear Element 1 ou L1)

Existem diversos tipos de elementos de DNA repetitivo no genoma, como as repetições longas intercaladas e as repetições em *tandem*. As

repetições intercaladas são compostas por diferentes elementos de retrotransposição, tais como as *LINE1*, as *Alu*, os elementos intercalados curtos, as sequências longas de repetição terminal e os transposons de DNA (85). Os transposons de DNA são capazes de cortarem-se e inserirem-se em outras sequências utilizando uma enzima chamada transposase (112). Esse mecanismo de “salto” foi responsável pela abundância na distribuição dessas sequências (85), que constituem 5% do genoma total de um indivíduo (113).

As sequências *Alu* e *LINE1* são os elementos de repetição mais abundantes e representam aproximadamente 30% de todo o genoma. Assim, essas sequências são amplamente utilizadas para estimar a metilação global do genoma humano (114).

É estimado que mais de um terço da metilação do DNA ocorra em elementos de repetição (114). Aproximadamente 80% dos dinucleotídeos CpG estão presentes em elementos de repetição, e esses dinucleotídeos estão geralmente metilados nessas sequências (115).

O cérebro apresenta uma elevada taxa de metilação de elementos de repetição quando comparada a outros tecidos (7). Em células precursoras neuronais é observada a capacidade de retrotransposição de *LINE1* que altera a expressão de genes neuronais e influencia no destino celular (116, 117). A presença da metilação nos elementos de repetição inibem a capacidade de retrotransposição e transcrição das sequências repetitivas, sendo que, a desmetilação ativa a transposição e a propagação de metilação aberrante para outros genes (118).

Em humanos, a hipometilação de DNA genômico foi observada em doenças associadas ao envelhecimento como o câncer (71). Em câncer de cólon a metilação de *LINE1* pode estar relacionada a melhor ou pior prognóstico da doença (119).

No envelhecimento normal, as sequências *Alu*, mas não as *LINE1* apresentam diminuição da metilação com a idade (73). No sangue periférico de indivíduos com DA, *LINE1* apresenta maior metilação em relação a controles pareados por idade e sexo. Os níveis de metilação foram associados ao escore

de testes cognitivos, sugerindo uma participação da metilação destas sequências na DA (120).

3 MÉTODOS

Foi delineado um estudo caso controle para investigar a expressão e metilação de genes candidatos e a metilação global em pacientes com DA.

3.1 Casuística

3.1.1 Sangue periférico

O presente estudo avaliou amostras de linfócitos de sangue periférico de 22 jovens, 23 idosos saudáveis e 34 pacientes com DA de ambos os sexos. A Tabela 2 apresenta as médias de idade \pm desvio padrão (DP) e a porcentagem de indivíduos do sexo feminino e masculino para cada grupo. Os grupos de idosos saudáveis e pacientes com DA apresentaram idades semelhantes ($p>0,05$) e os jovens sadios foram recrutados com idades variando entre 18 e 28 anos. A proporção entre os sexos não diferiu entre os grupos analisados ($p>0,05$).

Os idosos saudáveis obedeceram aos critérios de exclusão de sequela de acidente vascular encefálico, depressão profunda, demência vascular, baixos níveis cognitivos e alcoolismo. Adicionalmente, foi aplicada a escala padronizada para avaliação cognitiva o Mini-Exame do Estado Mental (MEEM) adaptada à população brasileira por Bertolucci e colaboradores (121), que analisa as funções corticais de forma simplificada e objetiva, mas com sensibilidade alta para captar alterações cognitivas. A funcionalidade foi avaliada utilizando a escala de Katz (122), que identifica o grau de dependência e classifica os pacientes em independentes, parcialmente dependentes e dependentes.

O presente estudo incluiu somente pacientes com a forma esporádica da DA, com idade acima de 65 anos e que apresentaram um mínimo de três anos de evolução da DA. Foi realizada anamnese e exame neurológico detalhado por neurologistas. Os critérios diagnósticos do *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke* e da *Alzheimer's Disease and Related Disorders Association* (NINCDS-ADRDA) foram utilizados para a caracterização da DA (123). Esses critérios foram estabelecidos com base no IV

Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV) com adaptações para o diagnóstico provável de DA, que consistem em perda da memória associada a outro domínio cognitivo, como linguagem, funções executivas, habilidades visuoespaciais e praxias associadas à perda da funcionalidade. Todos os pacientes com DA foram recrutados no Ambulatório de Neurologia do Comportamento da UNIFESP/EPM, sob supervisão do Prof. Dr. Paulo Henrique Ferreira Bertolucci. Dos trinta e quatro pacientes recrutados, quatro não recebiam medicação, dois recebiam outras medicações e vinte e oito recebiam tratamento com inibidores de acetilcolinesterase.

Todos os participantes receberam informações quanto aos objetivos e ao protocolo da pesquisa e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1) aprovado pelo comitê de ética da UNIFESP.

3.1.2 Tecido cerebral

Foram analisadas cerca de 10 amostras de tecido cerebral *post mortem* de idosos saudáveis e de 12 amostras de pacientes com DA. De cada paciente, foram coletadas amostras de tecido cerebral oriundas de três diferentes regiões cerebrais: córtices entorrinal e auditivo e hipocampo. As regiões cerebrais do córtex entorrinal e hipocampo foram selecionadas por serem áreas primariamente afetadas pela doença e o córtex auditivo por ser uma região afetada posteriormente. As amostras foram disponibilizadas pelo *The Brain Bank – Douglas Hospital Research Centre* (Montreal, Canadá) em colaboração com o Dr. Gustavo Turecki, do Departamento de Genética Psiquiátrica da Universidade McGill. Todas as amostras (com e sem DA) foram obtidas por autópsia, congeladas a -80 °C até o uso e processadas utilizando o mesmo protocolo.

Os pacientes com DA foram submetidos a uma triagem clínica rigorosa que permitiu o diagnóstico da DA, tanto pelo acompanhamento do paciente em vida, como por análise do cérebro *post mortem*. A duração da doença nos pacientes foi de no mínimo 3 anos de evolução. Seis pacientes com DA eram tratados com neurolépticos que atuam como antagonistas do receptor

de dopamina, dos quais, cinco pacientes recebiam haloperidol e um recebia risperidona. O período do tratamento variou entre 1 a 10 anos.

O grupo de idosos saudáveis não apresentava história de doença neurológica ou psiquiátrica. A Tabela 2 apresenta as médias de idades \pm DP e a porcentagem de indivíduos do sexo feminino e masculino para cada grupo. Idade e gênero não variaram entre os dois grupos ($p > 0.05$).

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UNIFESP com número de registro 1944/08 (Anexo 2).

Tabela 2: Caracterização das amostras de sangue periférico de jovens, idosos saudáveis e pacientes com Doença de Alzheimer e de tecido cerebral de idosos saudáveis e pacientes com Doença de Alzheimer.

Tecido	Grupo	N	Média Idade \pm DP	Sexo (%) ♀/♂
Sangue	Jovens	22	21,7 \pm 1,7	77,3/22,7
	Idosos saudáveis	23	72,1 \pm 10,5	73,9/26,1
	Pacientes com DA	34	75,5 \pm 9,1	73,5/26,5
Cérebro	Idosos saudáveis	10	78,5 \pm 8,9	60,0/40,0
	Pacientes com DA	12	81,0 \pm 6,5	58,0/42,0

DA: Doença de Alzheimer; N: Número de indivíduos; DP: Desvio Padrão; %: porcentagem; ♀: sexo feminino; ♂: sexo masculino.

3.2 Metodologia

As amostras coletadas foram utilizadas em metodologias diferentes com intuito de avaliar primeiramente a expressão gênica e, posteriormente, o controle epigenético dos promotores gênicos. Concomitantemente, foi avaliada a metilação global das amostras de cérebro de pacientes com DA e idosos controle. O estudo de metilação foi realizado no Departamento de Psiquiatria da Universidade de Londres – *King's College*, sob supervisão do Dr. Jonathan Mill. A figura 7 apresenta um fluxograma para a melhor compreensão das metodologias aplicadas a cada grupo de amostras.

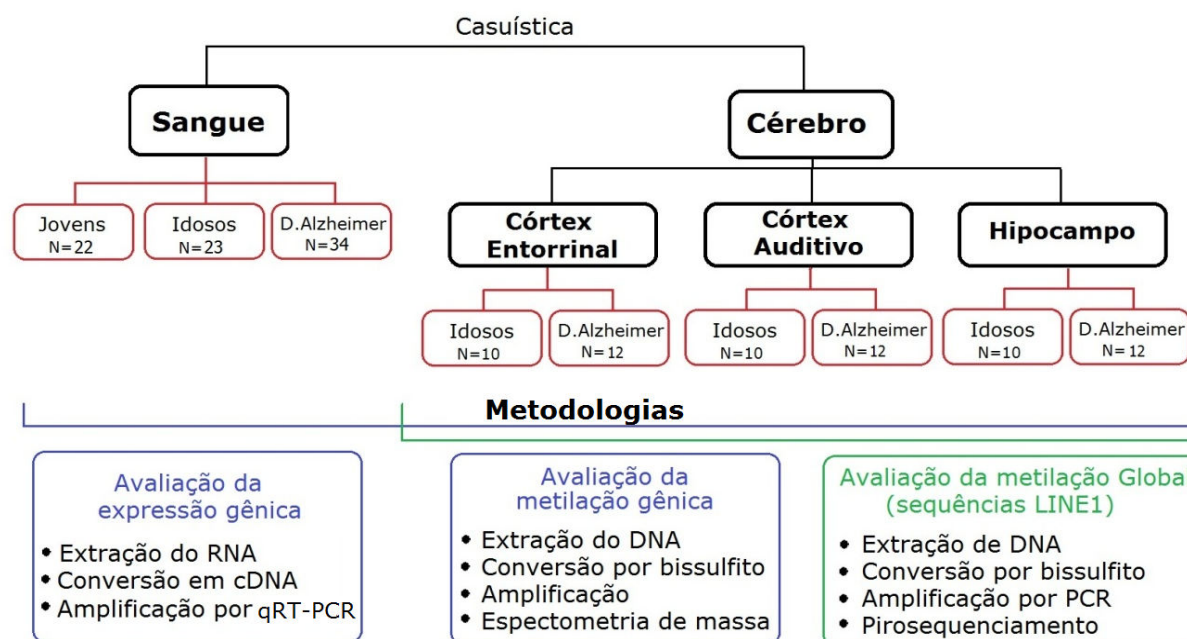


Figura 7: Resumo das técnicas realizadas no estudo, e respectivas amostras utilizadas. D. Alzheimer: Doença de Alzheimer; N: Número de indivíduos; qRT-PCR: *quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*

3.2.1 Extração de RNA e síntese de cDNA

Foram coletados 4 mL de sangue periférico de cada indivíduo e foi utilizado *RiboPure™-Blood Kit* (Ambion, EUA) para a extração de RNA, segundo instruções do fornecedor. Resumidamente, após a coleta de sangue, foi adicionada solução de lise (Tris-Cl [10mM] pH 8,0; EDTA [0,1M] pH8,0 e SDS 0,5%) e de acetato de sódio [4M] e, em seguida, solução de fenol-ácido/clorofórmio. Após 5 min à temperatura ambiente e breve centrifugação, a fase aquosa superior foi transferida para outro tubo ao qual foi adicionado etanol 100%. Alíquotas dessa mistura foram então transferidas a um filtro juntamente com tampão de lavagem e foram submetidas a sucessivas centrifugações. Em seguida, tampão de eluição (pré-aquecido a 75°C) foi adicionado ao filtro e a mistura passou por mais uma centrifugação. O RNA eluído foi então armazenado a -80 °C até a utilização nas etapas posteriores.

Em relação às amostras de cérebro, o tecido foi armazenado em *RNAlater® Tissue Collection* (Ambion, EUA), uma solução para estabilização de RNA, e estocado a -20 °C. Um pedaço de tecido (no máximo 100 mg) foi pulverizado em cadinho/pistilo com nitrogênio líquido. Após esse procedimento,

foi seguido o protocolo de extração de RNA por meio de *RNeasy[®] Lipid Tissue Mini Kit* (QIAGEN, Alemanha), segundo instruções do fabricante. Resumidamente, o tecido triturado foi homogeneizado em Qiazol e colocado à temperatura ambiente por 5 min. Após essa etapa, foi adicionado clorofórmio e a mistura foi mantida à temperatura ambiente por mais 3 min, e submetida à centrifugação a 12000 g/15 min/4 °C. Após centrifugação, a fase aquosa foi transferida para outro tubo ao qual foi adicionado etanol 70%. A mistura foi transferida para um tubo contendo uma coluna e centrifugada a 8000 g/15 s à temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado tampão de lavagem à coluna e a amostra foi submetida novamente à mesma centrifugação. Um novo tampão de lavagem foi adicionado e a mistura foi centrifugada inicialmente a 8000 g/15 s e, posteriormente, a 8000 g/2 min para secar a membrana da coluna. Por fim, para eluição do RNA, adicionou-se água *RNAse-free* na coluna e foi realizada uma centrifugação a 8000 g/1 min. As amostras de RNA foram estocadas a - 80°C até serem utilizadas.

A concentração de RNA e as razões de absorbância 230/260 e 260/280 foram medidas pelo aparelho NanoDrop (Spectrophotometer ND - 1000 - NANODROP, EUA) e somente amostras com valores de razões entre 1,9 e 2,1 foram selecionadas.

A síntese do DNA complementar (cDNA) a partir do RNA (Figura 8) utilizou *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* (Applied Biosystems™, EUA), no qual 1 µL de RNA total foi adicionado a um *Master Mix* contendo 2 µL de 10X *Reverse Transcription Buffer*, 0,8 µL de *dNPT Mix*, 2 µL de 10X *Reverse Transcription Random Primers*, 1 µL de *Reverse Transcriptase*, 1 µL de inibidor de RNase e 11,2 µL de *H₂O Nuclease-free*, totalizando um volume final de 20 µL. A mistura foi, submetida às seguintes etapas: 25 °C/10 min, 37 °C/120 min, 85 °C/5 min e, então, armazenada a 4 °C.

3.2.2 qRT-PCR (*quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*)

A análise da expressão dos genes alvos *DPYSL2*, *CNP*, *HSPA8* e *HSPA9* em sangue periférico e em tecido cerebral foi realizada por meio da técnica de qRT-PCR utilizando o ensaio *TaqMan*, com princípio na ação

exonuclease da *Taq DNA polimerase*, com uma sonda repórter fluorescente 5' e um *quencher* (silenciador) 3'. Após a desnaturação, os *primers* e a sonda se anelam aos seus alvos. Durante o passo de polimerização, a *Taq DNA polimerase* cliva e separa fisicamente a sonda repórter do *quencher*, resultando na liberação do sinal fluorescente (Figura 8) (124), que foi detectado pelo aparelho *7500 Fast Real-Time PCR* (Applied Biosystems™, EUA). O aumento do sinal é diretamente proporcional ao número de moléculas amplificadas durante cada ciclo.

No presente estudo, foram utilizados *primers* e sondas MGB *TaqMan*® (marcados com fluoróforo FAM™) dos ensaios de expressão gênica *TaqMan*® para todos os genes alvos (*DPYSL2* - Hs00954558-m1; *CNP* - Hs01018164-m1; *HSPA8* - Hs00941878-g1; *HSPA9* - Hs00945588-g1) comercializados pela Applied Biosystem (Applied Biosystems™, EUA). O gene β actina (*ACTB*: Hs03023943-g1) foi escolhido como controle endógeno para a reação e sua corrida foi realizada paralelamente à reação dos genes alvos estudados e seu ensaio. Cerca de 100ng de cDNA foi utilizado para cada reação de qRT-PCR. Todas as reações foram realizadas em triplicata. Somente uma pequena variação da triplicata foi tolerada, sendo que réplicas com DP de C_T (*cycle threshold*) >0,3 foram repetidas ou excluídas da análise.

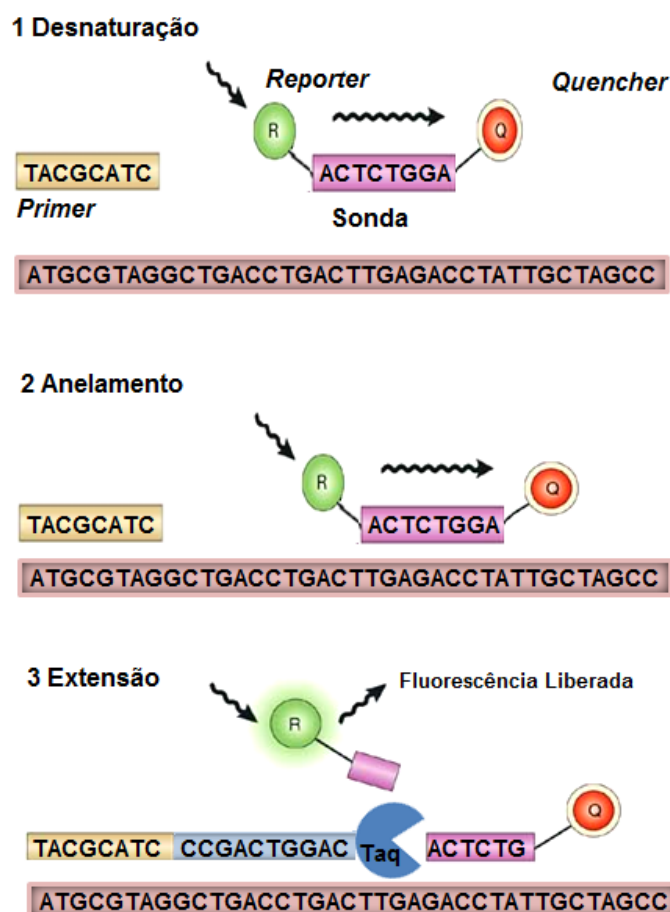


Figura 8: Amplificação por qRT-PCR, por meio do princípio do ensaio *TaqMan*. Resumidamente, após a desnaturação, o par de *primer* e a sonda se anelam aos seus alvos. Durante a extensão, a *Taq DNA polimerase* cliva e separa fisicamente a sonda repórter do *quencher*, resultando na liberação do sinal fluorescente, que é captado pelo aparelho. Q: *Quencher*, R: Repórter.

As condições da qRT-PCR padronizadas para todos os Ensaio de Expressão Gênica *TaqMan*[®] foram: 1 μ L de cDNA de cada amostra (100 ng/ μ L), 0,6 μ L do Ensaio de Expressão Gênica *TaqMan*[®] 20X e 6 μ L de *QuantiTect Probe PCR Master Mix 2X* (QIAGEN, Alemanha), completados com água para volume final de 12 μ L. A mistura passa por uma desnaturação inicial de 10 min a 94 °C, seguido de 45 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 s, anelamento e extensão a 60 °C por 60 s. A confiabilidade das amostras de RNA foi assegurada pela escolha de sondas *MGB Taqman*[®] que se estendem sobre junções éxon-éxon, e, dessa forma, o DNA genômico foi excluído como *template* das análises de expressão.

O *baseline* foi calculado automaticamente pelo aparelho e o *threshold* foi ajustado manualmente para cada gene estudado. O método escolhido para quantificação da expressão gênica foi o método C_T comparativo (Método $\Delta\Delta C_T$), que se baseia nos valores dos C_T dos genes alvos e do gene endógeno. O C_T é o número do ciclo no qual a fluorescência gerada dentro de uma reação cruza a linha *threshold*, que é fixado na fase exponencial da curva de amplificação. Isso indica que amostras com menores valores de C_T apresentam amplificação mais precoce, ou seja, possuem mais cópias de cDNA do gene estudado do que amostras que possuem um maior valor de C_T . É obtida uma média dos C_{Ts} para cada replicata técnica e é calculado o valor de ΔC_T ($C_{T \text{ gene alvo}} - C_{T \text{ gene endógeno}}$) para normalizar a quantidade de um alvo em relação à referência endógena escolhida. Os valores de $2^{-\Delta C_T}$ foram os valores utilizados para os cálculos estatísticos necessários. Adicionalmente, foi calculada a quantificação relativa (QR) com o uso da fórmula aritmética $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ($2^{-\Delta C_T \text{ grupo de interesse}} / 2^{-\Delta C_T \text{ grupo referência}}$) para avaliar o quanto um gene foi expresso no grupo de interesse em relação ao grupo referência. Os valores de C_T e ΔC_T foram calculados utilizando *7500 software 2.0*. Os dados gerados foram exportados para o Microsoft® Excel para o cálculo do $2^{-\Delta C_T}$ e da QR.

3.2.3 Análise estatística dos dados de expressão gênica

Inicialmente, foram realizados testes de normalidade (Shapiro-Wilk) para a variável dependente ($2^{-\Delta C_T}$), além de observar o tamanho amostral para cada análise, a fim de definir o teste estatístico a ser aplicado. Nas distribuições que não obedeceram à normalidade, as variáveis quantitativas foram transformadas utilizando a fórmula de escores-z, na qual o valor da média da variável é subtraído do valor do indivíduo, e esse valor é dividido pelo desvio padrão da variável.

Após a transformação para escores-z, foram utilizados testes paramétricos para todas as análises. Variáveis que apresentavam valores de escores-z superiores a 2,59 ou inferiores a -2,59 foram excluídas das análises a fim de excluir valores *outliers*.

Para a análise da expressão em sangue periférico, foi utilizado o teste ANOVA de uma via, com *post-hoc* de Bonferroni ($p < 0,05$) para avaliar se

há diferença na expressão dos genes entre os grupos de jovens, de idosos saudáveis e de pacientes com DA.

Para verificar se a expressão gênica de cada uma das diferentes regiões cerebrais diferiu entre idosos saudáveis e pacientes com DA, foi utilizado teste t de *Student*. Também foi utilizado o teste t de *Student* para avaliar se houve diferença de expressão entre sangue periférico e o tecido cerebral de idosos saudáveis e de pacientes com DA.

Nas análises em que houve diferenças significantes, foi realizado um Modelo Linear Geral (GLM) utilizando a presença do alelo $\epsilon 4$ de *APOE* como variável de interação, para corrigir uma possível influência do alelo nas análises.

A correlação de *Pearson* foi realizada para avaliar se os diferentes tecidos se comportavam da mesma maneira e poderia representar eventos associados em comum. Para essa análise, as amostras de tecido cerebral e sangue periférico foram pareadas por idade e sexo para minimizar possíveis vieses.

Os resultados estão apresentados como média de $2^{-\Delta CT} \pm DP$. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o pacote estatístico SPSS® 18.0 e a hipótese nula foi rejeitada com valores de $p < 0,05$.

3.2.4 Extração de DNA

A extração de DNA das amostras de sangue periférico foi realizada por meio de *QIAamp Blood midi Kit* (*QIAGEN*, Alemanha). a partir de 2 mL de sangue total. As amostras foram tratados com proteinase K e tampão de digestão por 10 min a 70 °C. Em seguida, 20 mL de etanol absoluto foi acrescentado ao produto de digestão. A mistura foi transferida para uma coluna contendo resina com afinidade por DNA e centrifugada por 5 min a 3000 rpm a temperatura ambiente. O DNA ligado à coluna foi submetido a sucessivas lavagens com soluções salinas contendo 70% ou 80% de etanol. Posteriormente, o DNA foi eluído da coluna com 600 μ L de tampão de eluição do *kit*. Posteriormente, o DNA foi ressuspendido em água estéril e armazenado a -80 °C até o momento de sua utilização.

3.2.5 Genotipagem das amostras para o gene *APOE*

As amostras foram genotipadas quanto aos polimorfismos rs429358 e rs7412 do gene *APOE* por meio da amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) seguida por digestão enzimática com *HhaI* (Fermentas, Canada) (125). A clivagem permite a detecção dos alelos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$ por determinação dos resíduos cisteína (Cys) ou arginina (Arg) nas posições 112 e 158 da cadeia polipeptídica.

A genotipagem das amostras foi realizada pelo grupo do Laboratório de Genética do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Marília – FAMEMA, sob supervisão do Dr. Spencer Luiz Marques Payão, que participou como colaborador em nosso estudo. A distribuição dos alelos do gene *APOE* em cada grupo biológico estudado está apresentada na Tabela 3.

Tabela 3: Distribuição dos alelos do gene *APOE* em todos os indivíduos avaliados no estudo.

Sangue e Cérebro	Alelos de <i>APOE</i>			Total
	$\epsilon 2$ N (%)	$\epsilon 3$ N (%)	$\epsilon 4$ N (%)	
Jovens	3 (7%)	36 (82%)	5 (11%)	44 (100%)
Idosos Saudáveis	4 (6%)	57 (86%)	5 (8%)	66 (100%)
Pacientes com DA	2 (2%)	61 (66%)	29 (32%)	92 (100%)

N: Número de indivíduos; DA: Doença de Alzheimer.

3.2.6 Modificação do DNA por bissulfito de sódio

Para a modificação do DNA por bissulfito de sódio, foi utilizado *EZ-96 DNA Methylation™ Kit* (Zymo Research, EUA). A conversão do DNA é realizada com uso de bissulfito de sódio, que apresenta propriedade oxidativa e promove a desaminação da base citosina, resultando em formação da base nitrogenada uracila. Esse fenômeno não ocorre quando, no lugar da citosina, encontra-se 5-metil-citosina.

Inicialmente, foi adicionado 500 ng de DNA (volume variável) de cada paciente ao *Conversion Plate*, e em cada poço foi adicionado 5 μ L de *M-Dilution Buffer* e volume suficiente de água livre de DNase para completar uma reação de 50 μ L. Posteriormente, o *Conversion Plate* foi incubado a 37 °C por 15 min. Na sequência, foram adicionados 100 μ L de *CT-Conversion Reagent* a cada

amostra e a placa foi incubada a 50 °C por 16 horas. Após este período, as amostras foram transferidas para outra placa - *Silicon-A™ Binding Plate*, contendo 400 µL de *M-Binding Buffer*. A placa foi então centrifugada a 3000 g por 5 min. Durante esse processo, ocorre a ligação do DNA modificado à coluna presente na placa, e esse DNA foi lavado com 500 µL de *M-Wash Buffer*, seguido de centrifugação a 3000 g por 5min. Posteriormente, foram adicionados 200 µL de *M-Desulphonation Buffer* a cada poço da placa e essa foi incubada em temperatura ambiente por 20 min. Por fim, a amostra foi novamente lavada, e eluída da coluna com 30 µL de *M-Elution Buffer*.

3.2.7 Análise de metilação por espectrometria de massa

Para a determinação da porcentagem de metilação dos promotores gênicos de *DPYSL2*, *CNP*, *HSPA8* e *HSPA9*, foi utilizada a técnica de espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight*). Basicamente, essa técnica baseia-se na amplificação e purificação das sequências gênicas por PCR convencional, seguida de uma transcrição *in vitro* do DNA para RNA e de uma clivagem enzimática para a determinação da porcentagem de metilação baseada na massa dos fragmentos. A massa dos fragmentos gerados varia de acordo com o nucleotídeo presente na sequência gênica, e, dessa forma, pode-se determinar se o DNA foi ou não convertido por bissulfito de sódio em decorrência do estado de metilação. Essa técnica é altamente sensível e capaz de detectar pequenas quantidades de amostra com uma acurácia de 99,99%.

3.2.7.1 Desenho de primers

O desenho dos *primers* para a amplificação por PCR foi realizado por meio do software *Epidesigner Beta-Sequenom®*. É necessário o desenho de *primers* que possuam uma cauda T7 incorporada ao oligonucleotídeo, pois essa sequência será utilizada na etapa de transcrição *in vitro* do DNA. Foi escolhido um tamanho máximo de 400 pb para os fragmentos amplificados, a utilização de ambas as fitas para seleção dos melhores *primers* e *primers* que fizessem a distinção por diferenças presentes em uracilas.

Após a obtenção de diferentes pares de *primers* para cada gene, as sequências foram avaliadas utilizando o pacote estatístico R com biblioteca MassArray (Figura 9). Essa análise foi realizada para verificar se as massas dos fragmentos obtidos pós-clivagem poderiam ser iguais e, dessa forma, não informativas no momento da espectrometria de massa.

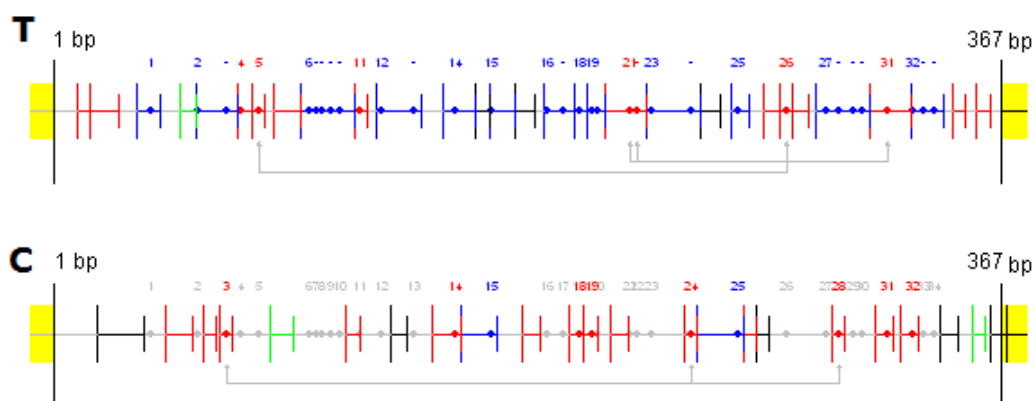


Figura 9: Análise de *primers* no pacote estatístico R para a predição de sequências com sobreposição de massa. Em vermelho, estão as CpGs com sobreposição que não serão informativas no MALDI-TOF. Em azul, as CpGs que serão analisadas. T= sequência promotora exposta à clivagem de timinas, C= sequência promotora exposta à clivagem de citosinas.

3.2.7.2 Amplificação gênica para determinação de metilação

A amplificação das regiões promotoras dos genes *DPYSL2*, *CNP*, *HSPA8* e *HSPA9* em amostras de sangue periférico e em tecido cerebral foi realizada por meio PCR. A reação de PCR foi realizada com 2 μ L de DNA convertido por bissulfito, 2 μ L de 10X *Buffer Qiagen*, 0,4 μ L de dNPT Mix [4 μ M], 0,5 μ L de cada *primer* [10 μ M], 0,4 μ L $MgCl_2$ [25 mM], 0,1 μ L de *Qiagen Hot Start Taq* e 14,1 μ L de água livre de nucleases, totalizando um volume final de 20 μ L. A mistura foi submetida às seguintes etapas: 95 °C/15 min, 95 °C/30 s, 56 °C/30 s, 72 °C/30 s, 72 °C/7 min e, em seguida, armazenada a -20 °C. Todas as amostras/reações foram realizadas em duplicata, e em todas as PCRs foram utilizados controles positivos (CP) e controles negativos (CN). O CP utilizado foi um DNA adquirido comercialmente cuja sequência de DNA está 100% metilada (*CpG Methylated HeLa Genomic DNA*, *New England Biolabs*, EUA). O CN

(branco) foi baseado em uma reação em que foi utilizado 2 μL de água livre de nucleases em vez de 2 μL de DNA modificado.

3.2.7.3 Purificação dos produtos de PCR, transcrição *in vitro* e clivagem enzimática

Para a purificação dos produtos de PCR amplificados, as amostras foram inseridas em uma placa de 384 poços e a cada amostra foi adicionado 1,70 μL de água livre de RNase e 0,30 μL de *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP). A reação foi incubada a 37 °C/40 min, 85 °C/5 min e 4 °C/10 min.

A cada amostra purificada foram adicionados 5 μL de mix contendo 3,21 μL de água livre de RNase, 0,89 μL de 5x *T7 Polymerase Buffer*, 0,22 μL de *Cleavage Mix (T Mix)*, 0,22 μL de DTT (100 mM), 0,40 μL de *T7 RNA & DNA Polymerase*, 0,06 μL de *RNaseA*. A reação foi incubada a 37 °C por 3 horas. Nessa etapa, o DNA é transcrito pela RNA polimerase, utilizando como iniciadora a sequência T7 acoplada a cada *primer*. Após a transcrição, ocorre a clivagem de citosinas e uracilas pela RNase A (Figura 10). Para limitar os sítios de corte da enzima, foi selecionada a clivagem preferencial de timinas – representada por U – utilizando o *Cleavage Mix (T Mix)*, que possui uma desoxicitosina (dCTP) resistente ao corte.

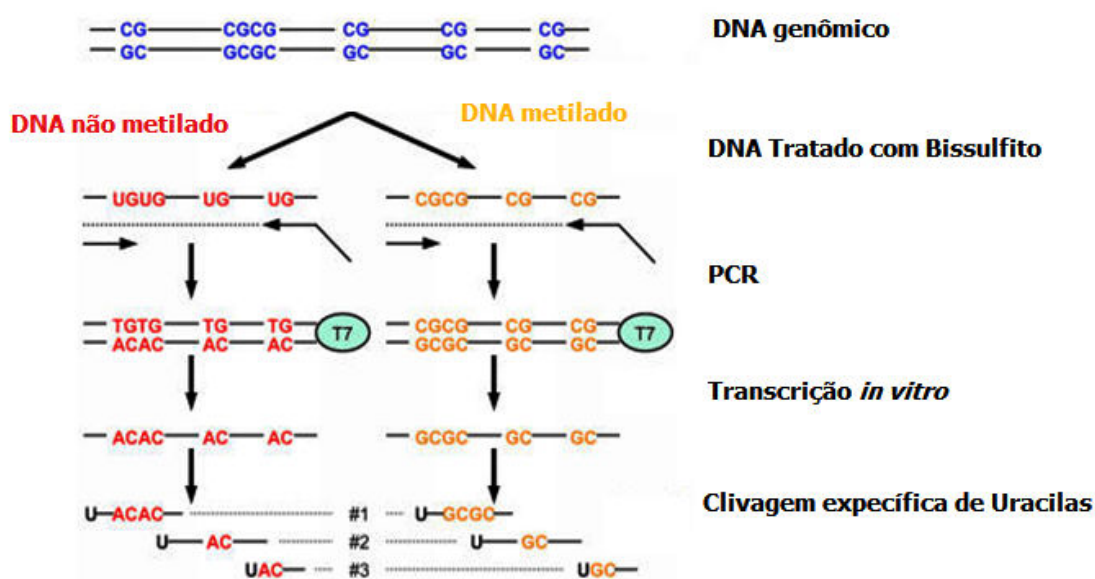


Figura 10: Resumo das etapas prévias à espectrometria de massa: Amplificação, transcrição e clivagem enzimática. Fonte: Modificado de (126).

3.2.7.4 Espectrometria de massa usando Sequenom-Epityper

Após a clivagem de timinas, foi adicionado a cada amostra 20 µL de água livre de RNase e resina para a limpeza do produto. A placa de 384 poços foi posicionada no robô MassARRAY® Nanodispenser (*Sequenom*, EUA) que insere a amostra em um chip *SpectroChip* (*Sequenom*, EUA). Cada amostra inserida no chip é irradiada com um laser pulsante, acelerada em um campo elétrico e entra em um cilindro de vôo (*flight tube*). Durante o vôo, as diferentes moléculas que compõem a amostra são separadas. Na análise de metilação, a diferença de massa de uma guanina para uma adenina é de 16 Da. O espectrômetro de massa foi calibrado com *4-points calibrator* (*Sequenom*, EUA), que contém moléculas de massa de 1479,0 Da, de 3004,0 Da, de 5044,4 Da e de 8486,6 Da.

A diferença de massa entre guaninas e adeninas foi interpretada por *MassARRAY®EpiTYPER 1.0 software*, e a sequência do DNA foi determinada com respectivas porcentagens de metilação de cada CpG. Quando CpGs foram avaliadas individualmente, buscou-se possíveis sítios de ligação para fatores de transcrição que possam ser inibidos pela adição do radical metil. Além das porcentagens individuais de cada CpG, também foi calculada a média de metilação de cada promotor gênico levando em consideração a metilação de todos os CpGs dentro do amplicon.

3.2.8 Análise de metilação global por Pirosequenciamento

Para a determinação da metilação global, foi utilizada a técnica de pirosequenciamento, que se baseia na detecção da atividade da polimerase por enzimas quimioluminescentes. Resumidamente, um nucleotídeo é adicionado por vez na reação, e, quando incorporado à sequência do DNA, é liberado um pirofosfato (PPi). Esse PPi é utilizado pela enzima sulfúrilase e é convertido em ATP. A enzima luciferase utiliza o ATP como substrato e o converte em luz. A luminescência é captada pelo aparelho que registra a base incorporada. Após um ciclo, inicia-se outra liberação de um nucleotídeo por vez para a determinação da base adjacente. Se nucleotídeo liberado não for

complementar à sequência de DNA, não será incorporado à sequência. Dessa forma, um nucleotídeo diferente e complementar será adicionado a sequência.

Para o pirosequenciamento de *LINE1*, foi, inicialmente, realizada uma PCR convencional utilizando os *primers* do *kit* comercial *PyroMark_Q24_CPG_Line1* (Qiagen, Alemanha). Nesse *kit*, é fornecido um par de *primers* para a amplificação por PCR, dos quais o *primer forward* é biotilado e atua como uma sequência iniciadora para a reação de pirosequenciamento. A reação de PCR foi realizada com 2 µL de DNA convertido por bissulfato de sódio, 2 µL de 10X *Buffer Qiagen*, 0,4 µL de dNTP *Mix*, 0,5 µL de cada *primer* [10 µM], 0,4 µL MgCl₂ [25 mM], 0,1 µL de *Qiagen Hot Start Taq* e 14,1 µL de água livre de nucleases, totalizando um volume final de 20 µL. A mistura foi submetida às seguintes etapas: 95 °C/15 min, 95 °C/30 s, 56 °C/30 s, 72 °C/30 s, 72 °C/7 min. Após a reação de pirosequenciamento, as amostras foram armazenadas a -20 °C.

Após a PCR, foi realizado o isolamento dos amplicons para posterior sequenciamento. Para isso, 18 µL de cada produto de PCR foi incubado com 2 µL de *beads* magnéticos, 40 µL de *Binding Buffer* e 20 µL de água livre de nucleases por 10 min sob agitação. Após a incubação, as amostras foram levadas à estação de lavagem. Inicialmente, foi realizada a aspiração das amostras por vácuo, e, posteriormente, os capilares que continham as amostras foram imersos em etanol 70% e NaOH [7M] por 5 s para desnaturação. Após a desnaturação, apenas as fitas de DNA que possuíam o *primer* biotilado ligados às *beads* permaneceram nos capilares e foram transferidas para uma placa de sequenciamento. A cada amostra foram adicionados 0,75 µL do *primer* de sequenciamento (10 µM) e 24,35 µL de *annealing buffer*. Posteriormente, as amostras foram incubadas a 80 °C por 2 min.

Por fim, foram adicionados no distribuidor do aparelho 90 µL de substrato, 90 µL de enzimas e 60 µL de cada DNTP que foram utilizados para o sequenciamento. Utilizando o *Pyromark Q24 software*, foi determinada a sequência de *LINE1* a ser avaliada.

3.2.9 Análise estatística dos dados de metilação

Inicialmente, foi realizado o teste de normalidade (Shapiro-Wilk) para as variáveis quantitativas, além de observar o tamanho amostral para cada análise para definir o teste adequado para as subseqüentes análises. Nas distribuições que não obedeceram à normalidade, as variáveis quantitativas foram transformadas em escores-z e foram utilizados testes paramétricos para todas as análises. Foram excluídas das análises os valores *outliers* – amostras que apresentavam valores de escores-z superiores a 2,59 ou inferiores a -2,59. Nas comparações dois a dois, foi utilizada a correção de Bonferroni, na qual o índice de significância ($p=0,05$) é dividido pelo número de testes independentes realizados com a finalidade de diminuir a quantidade de resultados falsos positivos.

Foi utilizado o teste ANOVA de uma via com *post-hoc* de Bonferroni para a análise da metilação em sangue periférico e para a análise de metilação em tecido cerebral, na qual foi comparado as três regiões cerebrais (córtices entorrinal e auditivo, e hipocampo) no grupo de idosos saudáveis e no do grupo de pacientes com DA

O teste t de *Student* foi utilizado para verificar se a metilação gênica de cada uma das diferentes regiões cerebrais diferiu entre idosos saudáveis e pacientes com DA. Esse teste também foi utilizado para verificar se houve diferença de metilação entre sangue periférico de idosos saudáveis e de pacientes com DA e o tecido cerebral.

Foi utilizado o teste ANOVA de uma via com *post-hoc* de Bonferroni para a comparação de metilação global (*LINE1*) entre as três regiões cerebrais (córtices entorrinal e auditivo, e hipocampo) tanto dentro do grupo de idosos saudáveis quanto do grupo de pacientes com DA.

Nas análises em que houve diferenças significantes, foi realizado um GLM utilizando a presença do alelo $\epsilon 4$ de *APOE* como variável de interação para corrigir uma possível influência do alelo nas análises.

Os resultados estão apresentados como média de metilação \pm DP, além dos valores individuais de cada CpG que compunham as sequências gênicas (Anexos 4-21). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o pacote estatístico SPSS[®] 18.0 e a hipótese nula foi rejeitada com valores de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Análise da expressão e da metilação de genes candidatos

4.1.1 *DPYSL2*

4.1.1.1 Análise de expressão e metilação em sangue periférico

Na análise de expressão do gene *DPYSL2*, foram avaliadas 16, 23 e 34 amostras de sangue periférico dos grupos de jovens, idosos saudáveis e pacientes com DA.

No sangue periférico, a expressão do gene *DPYSL2* diferiu entre os três grupos analisados ($F=5,25$; $p=0,01$). A análise de *post hoc* demonstrou uma diferença significativa entre o grupo de pacientes com DA e jovens, e entre o grupo de idosos e jovens saudáveis. Não foi observada diferença significativa entre pacientes com DA e idosos saudáveis (Tabela 4; Figura 11). O teste GLM para correção da influência do alelo $\epsilon 4$ de *APOE* demonstrou uma diferença estatisticamente significativa entre os três grupos, sendo mantida a diferença entre o grupo de pacientes com DA e jovens, assim como entre o grupo de idosos e jovens saudáveis (Tabela 4; Figura 11).

Para o cálculo da QR, foi utilizado o grupo de idosos como referência. O grupo de jovens saudáveis apresentou maior expressão do gene ($QR=11,67$) e o grupo de pacientes com DA apresentaram uma menor expressão do gene ($QR=0,62$) em relação aos idosos saudáveis (Tabela 4).

Não foi possível realizar as análises de metilação do gene *DPYSL2* no sangue periférico de todos os grupos. Dessa forma, não foi possível avaliar se a metilação do DNA é responsável pela diferença na expressão do gene *DPYSL2* observada entre os grupos.

Tabela 4: Expressão do gene *DPYSL2* em sangue periférico do grupo de pacientes com Doença de Alzheimer, de idosos saudáveis e de jovens

Sangue	N	2 ^{-ΔCT} Médio	Desvio Padrão	p*	Post hoc*	p#	Post hoc#	QR
Jovens	16	638,02	1398,67		DA x Idosos p=1,00		DA x Idosos p=1,00	11,67
Idosos	23	54,68	104,00	0,01	DA x Jovens p=0,01	<0,001	DA x Jovens p<0,001	1
DA	34	33,86	22,96		Idosos x Jovens p=0,02		Idosos x Jovens p<0,001	0,62

N: Número de indivíduos; p*: teste ANOVA; *Post hoc**: *post hoc* do teste ANOVA; p# teste GLM ajustado para a presença do alelo ε4; *Post hoc*#: *post hoc* do teste GLM ajustado para a presença de ε4; DA: Doença de Alzheimer; QR: Quantificação relativa em relação aos idosos.

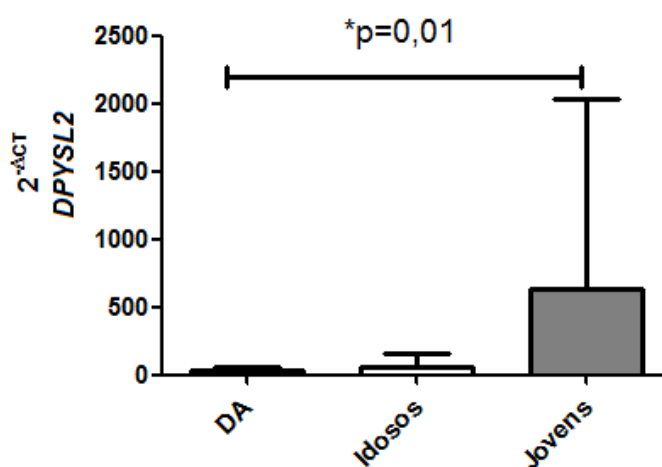


Figura 11: Expressão de *DPYSL2* em sangue periférico. Comparação dos valores de 2^{-ΔCT} do gene *DPYSL2* entre os grupos de jovens, idosos e pacientes com Doença de Alzheimer em sangue periférico. DA: Doença de Alzheimer. * Comparação entre os grupos utilizando teste ANOVA.

4.1.1.2 Análise de expressão e metilação em tecido cerebral

Foram avaliadas 8, 9 e 9 amostras de córtex entorrinal, de córtex auditivo e de hipocampo, respectivamente, do grupo de idosos saudáveis. No grupo de pacientes com DA, foram avaliadas 10, 11 e 11 amostras do córtex entorrinal, do córtex auditivo e do hipocampo, respectivamente.

Não foi observada uma diferença significativa na expressão de *DPYSL2* no córtex entorrinal, no córtex auditivo e no hipocampo, entre os pacientes com DA e idosos saudáveis (Tabela 5; Figura 13).

Foi utilizado o grupo de idosos saudáveis como referência para o cálculo da QR. Todas as regiões cerebrais apresentaram níveis de expressão

diminuídos no grupo de pacientes com DA em relação ao grupo de idosos saudáveis, porém sem diferença significativa de expressão entre os grupos (Tabela 5).

Não foi observada diferença na média de metilação no córtex entorrinal, no córtex auditivo e no hipocampo entre o grupo de idoso saudáveis e pacientes com DA, sendo que todas as regiões apresentaram baixos níveis de metilação de *DPYSL2* (Tabela 6; Figura 12). Não foi observada também, diferença entre a metilação dos sítios CpGs do gene *DPYSL2* nas regiões cerebrais entre idosos e pacientes com DA (Anexo 4).

No grupo de idosos saudáveis, a expressão do gene *DPYSL2* não diferiu entre as três regiões cerebrais analisadas ($F=1,05$, $p=0,37$). No grupo de pacientes com DA, também não houve diferença de expressão entre as três regiões cerebrais avaliadas ($F=1,29$, $p=0,29$). Adicionalmente, não foi observada diferença na média de metilação entre as regiões analisadas tanto no grupo de idosos saudáveis ($F=1,05$, $p=0,37$) como no de pacientes com DA ($F=1,29$, $p=0,29$) (Tabela 6). Não foi observada diferença na metilação de sítios CpGs específicos entre as regiões cerebrais em cada grupo (Anexo 5).

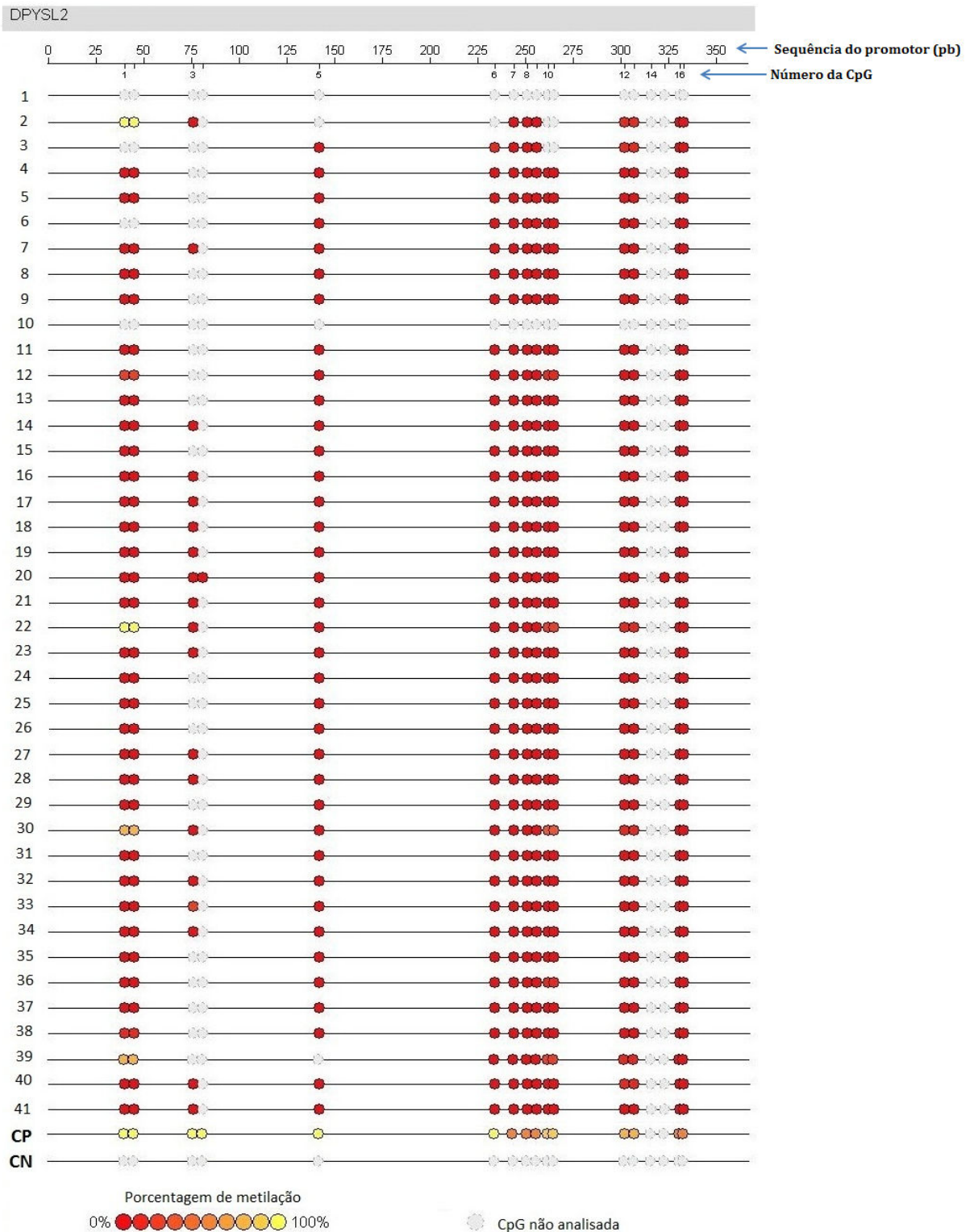


Figura 12: Epigramma ilustrativo resultante da análise de espectrometria de massa para o gene *DPYSL2* de 41 amostras aleatoriamente dispostas dos indivíduos jovens, idosos e de pacientes com Doença de Alzheimer. CP: controle positivo de metilação – 100% metilado. CN: controle negativo da reação.

Tabela 5: Expressão do gene *DPYSL2* nas três regiões cerebrais de pacientes com Doença de Alzheimer e de idosos saudáveis.

Região Cerebral	Idosos Saudáveis			Pacientes com DA			p*	p [#]	QR
	N	2 ^{-ΔCT} Médio	Desvio padrão	N	2 ^{-ΔCT} Médio	Desvio padrão			
Córtex Entorrinal	8	5,63	3,51	10	3,34	1,27	0,12	0,23	0,59
Córtex Auditivo	9	6,38	4,09	11	4,03	1,43	0,13	0,16	0,63
Hipocampo	9	9,93	9,90	11	5,18	4,13	0,16	0,21	0,52

N: Número de indivíduos; p*: teste t de *Student*; p[#]: teste GLM ajustado para a presença do alelo ε4; DA: Doença de Alzheimer; QR: Quantificação relativa em relação aos idosos.

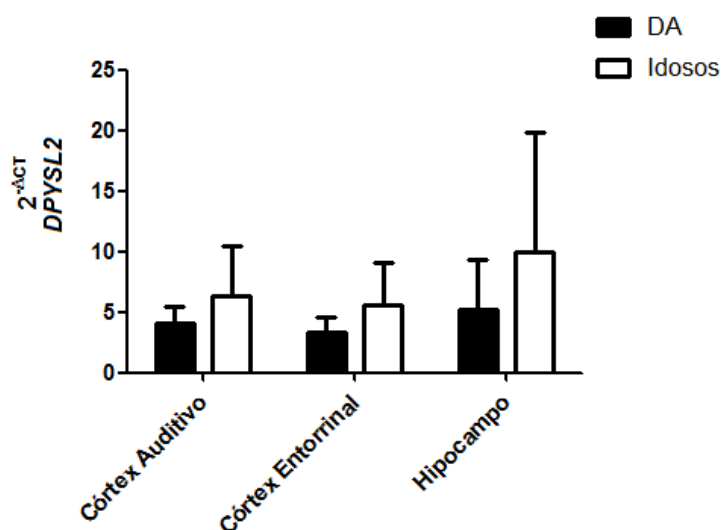


Figura 13: Expressão de *DPYSL2* em tecido cerebral de pacientes com DA e idosos saudáveis. Comparação dos valores de 2^{-ΔCT} do gene *DPYSL2* no córtex entorrinal, córtex auditivo e hipocampo entre o grupo de pacientes com Doença de Alzheimer e de idosos saudáveis. DA: Doença de Alzheimer.

Tabela 6: Metilação do gene *DPYSL2* nas diferentes regiões cerebrais do grupo de pacientes com Doença de Alzheimer e grupo de idosos saudáveis.

Região Cerebral	Idosos Saudáveis			Pacientes com DA			p*	p [#]
	N	Média de metilação	Desvio padrão	N	Média de metilação	Desvio padrão		
Córtex Entorrinal	8	0,03	0,01	9	0,03	0,01	0,52	0,08
Córtex Auditivo	8	0,03	0,01	10	0,03	0,01	0,78	0,79
Hipocampo	9	0,04	0,01	11	0,05	0,05	0,79	0,92

N: Número de indivíduos; p*: teste t de *Student*; p[#]: teste GLM ajustado para a presença do alelo ε4; DA: Doença de Alzheimer.

Adicionalmente, foi observado que a expressão de *DPYSL2* no tecido cerebral (sem a subdivisão de regiões) diferiu entre o grupo de idosos e o de pacientes com DA (Tabela 7; Figura 14). A expressão no tecido cerebral foi menor nos pacientes com DA do que nos idosos controles (QR=0,57). O teste GLM para correção da influência do alelo $\epsilon 4$ de *APOE* demonstrou diferença estatisticamente significativa entre pacientes com DA e idosos saudáveis. Entretanto, não foi observada diferença nas médias de metilação ($p=0,59$) (Tabela 8) e em CpGs específicas do promotor de *DPYSL2* entre os dois grupos de análise (Anexo 6).

Tabela 7: Expressão do gene *DPYSL2* em tecido cerebral de pacientes com Doença de Alzheimer e de idosos saudáveis.

Grupo	N	$2^{-\Delta CT}$ Médio	Desvio padrão	p^*	$p^\#$	QR
Idosos Saudáveis	26	6,62	7,38	0,02	0,001	1
Pacientes com DA	32	4,21	2,68			0,57

N: Número de indivíduos; p^* : teste t de *Student*; $p^\#$: teste GLM ajustado para a presença do alelo $\epsilon 4$; DA: Doença de Alzheimer; QR: Quantificação relativa em relação aos idosos.

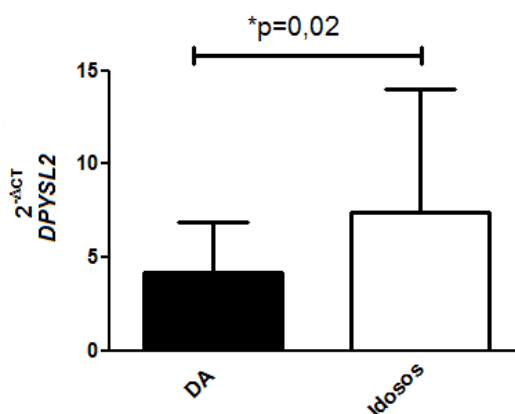


Figura 14. Expressão de *DPYSL2* em tecido cerebral em pacientes com Doença de Alzheimer e em idosos saudáveis. Comparação dos valores de $2^{-\Delta CT}$ do gene *DPYSL2* no tecido cerebral de pacientes com Doença de Alzheimer e de idosos saudáveis. DA: Doença de Alzheimer. * Comparação entre os grupos utilizando teste t de *Student*.

Tabela 8: Metilação do gene *DPYSL2* em tecido cerebral de pacientes com Doença de Alzheimer e de idosos saudáveis.

Grupo	N	Média de metilação	Desvio padrão	p^*	$p^\#$
Idosos Saudáveis	25	0,01	0,03	0,59	0,43
Pacientes com DA	30	0,04	0,03		

N: Número de indivíduos; p^* : teste t de *Student*; DA: Doença de Alzheimer.

4.1.1.3 Comparação da expressão e da metilação entre sangue periférico e tecido cerebral

A expressão do gene *DPYSL2* diferiu significativamente entre amostras de sangue periférico e de tecido cerebral tanto para o grupo de idosos saudáveis quanto para o grupo de pacientes com DA (Tabela 9; Figuras 15 A e B). O teste GLM utilizando o alelo $\epsilon 4$ de *APOE* como variável de interação reforçou a presença de diferença estatística entre sangue periférico do grupo de pacientes com DA, porém, a diferença entre os tecidos não foi mantida no grupo de idosos saudáveis.

Para o cálculo da QR, foi utilizado o sangue periférico como referência em relação ao cérebro. O tecido cerebral apresentou menor expressão do gene *DPYSL2* em relação ao sangue periférico em idosos saudáveis (QR=0,13) e em pacientes com DA (QR=0,12) (Tabela 9).

Não foi observada correlação significativa na expressão de *DPYSL2* entre o tecido cerebral e o sangue tanto em amostras de pacientes com DA ($R=-0,02$; $p=0,99$) quanto em idosos saudáveis ($R=0,35$; $p=0,35$).

Não foi possível realizar as comparações dos níveis de metilação do promotor de *DPYSL2* entre o sangue periférico e o tecido cerebral devido à ausência de sucesso na análise de espectrometria de massa. Dessa forma, também não foi possível avaliar se o controle epigenético foi responsável pela diferença na expressão do gene *DPYSL2* observada entre os diferentes tecidos.

Tabela 9: Expressão do gene *DPYSL2* em sangue periférico e tecido cerebral de pacientes com Doença de Alzheimer e de idosos saudáveis.

Tecido	Idosos Saudáveis						Pacientes com DA					
	N	2 ^{-ΔCT} Médio	Desvio padrão	p*	p [#]	QR	N	2 ^{-ΔCT} Médio	Desvio padrão	p*	p [#]	QR
Sangue	23	54,68	104,00	0,04	0,04	0,13	34	33,86	22,96	<0,001	<0,001	0,12
Cérebro	26	7,38	6,62				32	4,21	2,68			

N: Número de indivíduos; p*: teste t de Student; p[#]: teste GLM ajustado para a presença do alelo $\epsilon 4$; DA: Doença de Alzheimer; QR: Quantificação relativa em relação ao sangue.

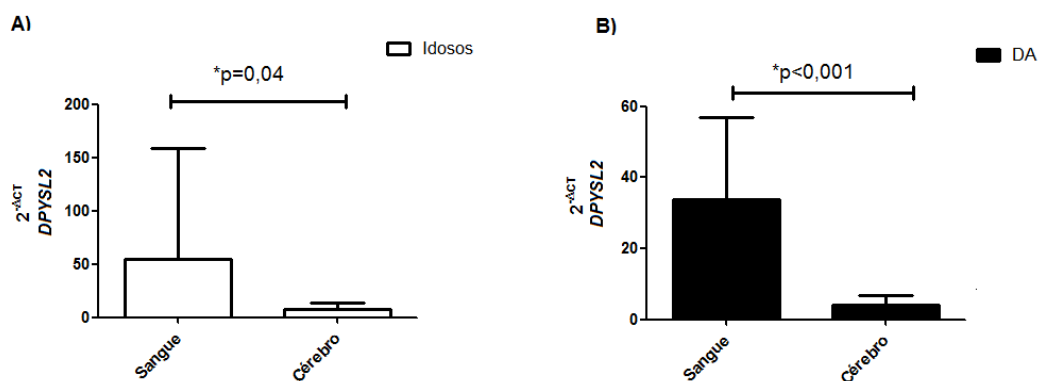


Figura 15. Expressão de *DPYSL2* em sangue periférico e tecido cerebral. **A)** Comparação dos valores de $2^{-\Delta CT}$ do gene *DPYSL2* entre o sangue periférico e o tecido cerebral de idosos saudáveis. **B)** Comparação dos valores de $2^{-\Delta CT}$ do gene *DPYSL2* entre o sangue periférico e o tecido cerebral de pacientes com DA. DA: Doença de Alzheimer. * Comparação entre os grupos utilizando teste t de Student.

4.1.2 CNP

4.1.2.1 Expressão e metilação em sangue periférico

Para a análise de expressão do gene *CNP*, foram avaliadas 16, 23 e 34 amostras de sangue periférico dos grupos de jovens, idosos saudáveis e pacientes com DA, respectivamente. Para a avaliação da metilação, foram analisados 19, 20 e 29 amostras de sangue periférico dos grupos de jovens, idosos saudáveis e pacientes com DA, respectivamente.

No sangue periférico, a expressão de *CNP* diferiu entre os três grupos analisados. A análise *post hoc* demonstrou uma diferença significativa entre o grupo de pacientes com DA e jovens, e entre o grupo de idosos saudáveis e jovens. Não foi observada diferença significativa entre pacientes com DA e idosos saudáveis (Tabela 10; Figura 16). O teste GLM para correção da influência do alelo $\epsilon 4$ de *APOE* demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos, assim como a diferença entre o grupo de pacientes com DA e jovens, e entre o grupo de idosos e jovens saudáveis, foram mantidas.

Para o cálculo da QR, foi utilizado o grupo de idosos como referência. O grupo de jovens saudáveis apresentou maior expressão do gene (QR=9,21) e o

grupo de pacientes com DA apresentaram uma menor expressão do gene (QR=0,11) em relação aos idosos saudáveis (Tabela 10).

A média de metilação diferiu entre os três grupos analisados. A análise *post hoc* demonstrou diferença significativa na média da metilação entre o grupo de pacientes com DA e jovens, e uma tendência de diferença entre o grupo de idosos e jovens (Tabela 11). Na análise pelo teste GLM, a diferença na média de metilação se manteve (Tabela 11).

Adicionalmente, foi observada uma diferença pontual na sequência de *CNP* (CpG 7) ($F=7,83$, $p=0,001$). Essa citosina apresentou maior metilação no grupo de pacientes com DA ($0,05\pm 0,02$) em relação aos idosos e jovens ($0,03\pm 0,02$) (Anexo 7). Os níveis de metilação foram extremamente baixos em todos os grupos, não superando 1% de metilação (Tabela 11; Figura 17).

Tabela 10: Expressão do gene *CNP* em sangue periférico de pacientes com Doença de Alzheimer, de idosos saudáveis e de jovens.

Sangue	N	$2^{-\Delta CT}$ Médio	Desvio Padrão	p^*	<i>Post hoc</i> *	$p^\#$	<i>Post hoc</i> #	QR
Jovens	16	306,86	401,58		DA x Idosos $p=1,00$		DA x Idosos $p=1,00$	9,21
Idosos	23	33,32	22,55	<0,001	DA x Jovens $p<0,001$	<0,001	DA x Jovens $p<0,001$	1,00
DA	34	33,91	23,07		Idosos x Jovens $p<0,001$		Idosos x Jovens $p<0,001$	0,11

N: Número de indivíduos; p^* : teste ANOVA; *Post hoc**: *post hoc* do teste ANOVA; $p^\#$ teste GLM ajustado para a presença do alelo $\epsilon 4$; *Post hoc*#: *post hoc* do teste GLM ajustado para a presença de $\epsilon 4$; DA: Doença de Alzheimer; QR: Quantificação relativa em relação aos idosos.

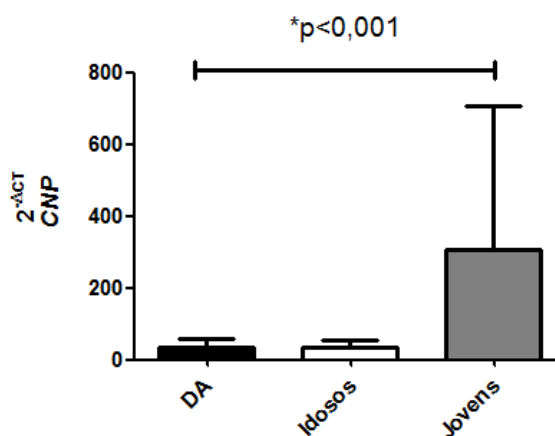


Figura 16: Expressão de *CNP* em sangue periférico. Comparação dos valores de $2^{-\Delta CT}$ do gene *CNP* entre os grupos de jovens, idosos e pacientes com Doença de Alzheimer em sangue periférico. DA: Doença de Alzheimer. * Comparação entre os grupos utilizando teste ANOVA.

Tabela 11: Metilação do gene *CNP* em sangue periférico de pacientes com Doença de Alzheimer, de idosos saudáveis e de jovens.

Sangue	N	Média de metilação	Desvio padrão	p*	Post hoc*	p#	Post hoc#
Jovens	19	0,03	0,00		DA x Idosos p= 1,00		DA x Idosos p= 1,00
Idosos	20	0,03	0,01	0,03	DA x Jovens p<0,001	0,05	DA x Jovens p=0,002
DA	29	0,03	0,01		Idoso x Jovens p<0,001		Idoso x Jovens p=0,003

N: Número de indivíduos; p*: teste ANOVA; *Post hoc**: *post hoc* do teste ANOVA; p# teste GLM ajustado para a presença do alelo $\epsilon 4$; *Post hoc*#: *post hoc* do teste GLM ajustado para a presença de $\epsilon 4$; DA: Doença de Alzheimer.

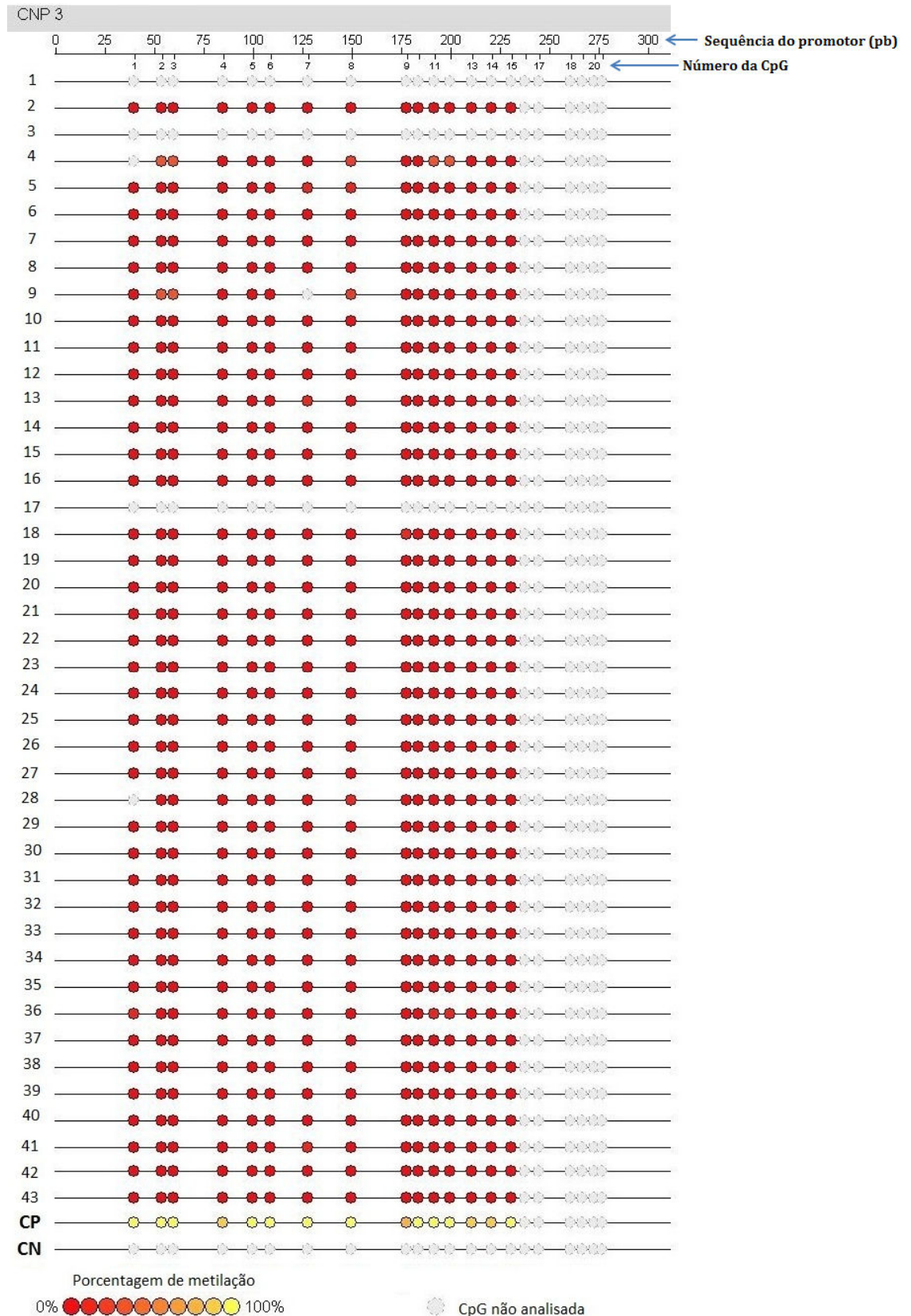


Figura 17: Epigrama ilustrativo resultante da análise de espectrometria de massa para o gene *CNP* de 43 amostras aleatoriamente dispostas dos indivíduos jovens, idosos e de pacientes com Doença de Alzheimer. CP: controle positivo de metilação – 100% metilado. CN: controle negativo da reação.

4.1.2.2 Expressão e metilação em tecido cerebral

Para a análise de expressão e metilação do gene *CNP*, foram avaliadas 8, 9 e 9 amostras de córtex entorrinal, córtex auditivo e hipocampo, respectivamente, do grupo de idosos saudáveis. No grupo de pacientes com DA, foram avaliadas 10, 11 e 11 amostras de córtices entorrinal e auditivo e de hipocampo, respectivamente.

Foi observada diferença estatisticamente significativa na expressão de *CNP* no córtex auditivo e no córtex entorrinal entre os pacientes com DA e idosos. Por outro lado, não foi observada diferença significativa entre o hipocampo dos dois grupos (Tabela 12; Figura 18).

Foi utilizado o grupo de idosos saudáveis como referência para o cálculo da QR. Todas as regiões cerebrais apresentaram níveis de expressão diminuídos no grupo de pacientes com DA em relação ao grupo de idosos saudáveis (Tabela 12).

Não houve diferença na metilação de *CNP* nas três regiões cerebrais entre os grupos (Tabela 13, Anexo 8). Foi observada hipometilação em todas as amostras, com porcentagens de metilação abaixo de 1% (Tabela 13; Figura 17).

Não houve diferença na expressão de *CNP* entre as três regiões cerebrais analisadas tanto no grupo de idosos ($F=0,12$; $p=0,89$) quanto em pacientes com DA ($F=1,97$, $p=0,16$). Também não foi observada diferença na metilação de CpGs individuais (Anexo 9) e na média de metilação entre as três regiões no grupo de idosos saudáveis ($F=0,12$, $p=0,89$) e no grupo de pacientes com DA ($F=1,00$, $p=0,38$) (Tabela 13).

Tabela 12: Expressão do gene *CNP* nas três regiões cerebrais de pacientes com Doença de Alzheimer e de idosos saudáveis.

Região Cerebral	Idosos Saudáveis			Pacientes com DA			p*	p [#]	QR
	N	2 ^{-ΔCT} Médio	Desvio padrão	N	2 ^{-ΔCT} Médio	Desvio padrão			
Córtex Entorrinal	8	6,02	3,10	10	3,15	1,25	0,04	0,01	0,52
Córtex Auditivo	9	6,63	3,88	11	3,70	1,66	0,04	0,02	0,56
Hipocampo	9	6,67	1,90	11	5,42	4,23	0,43	0,64	0,81

N: Número de indivíduos; p*: teste t de *Student*, p[#] teste GLM ajustado para a presença do alelo ε4;

DA: Doença de Alzheimer; QR: Quantificação relativa em relação aos idosos.

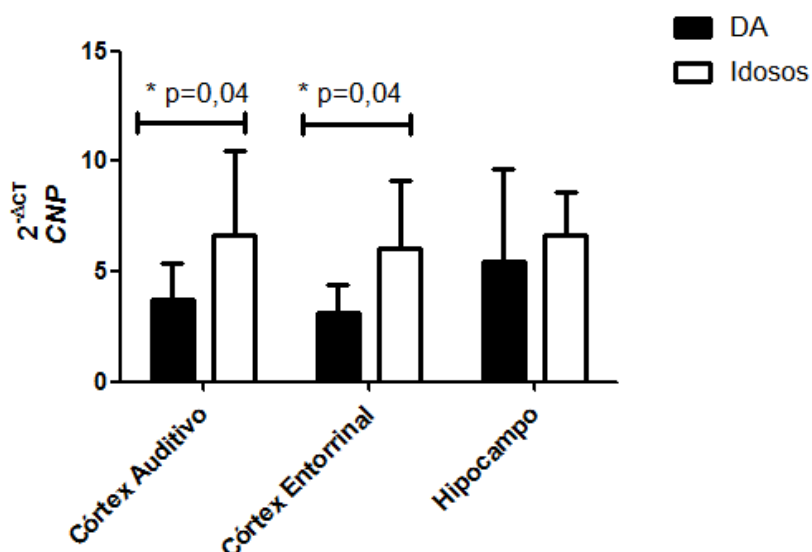


Figura 18: Expressão de *CNP* em tecido cerebral de pacientes com DA e idosos saudáveis. Comparação dos valores de $2^{-\Delta CT}$ do gene *CNP* no córtex entorrinal, córtex auditivo e hipocampo entre o grupo de pacientes com Doença de Alzheimer e de idosos saudáveis. DA: Doença de Alzheimer. * Comparação entre os grupos utilizando teste t de *Student*.

Tabela 13: Metilação do gene *CNP* nas três regiões cerebrais de pacientes com Doença de Alzheimer e de idosos saudáveis.

Região Cerebral	Idosos Saudáveis			Pacientes com DA			p*	p [#]
	N	Média de metilação	Desvio padrão	N	Média de metilação	Desvio padrão		
Córtex Entorrinal	10	0,04	0,01	11	0,04	0,01	0,92	0,59
Córtex Auditivo	9	0,04	0,01	12	0,03	0,00	0,45	0,82
Hipocampo	10	0,03	0,01	12	0,03	0,00	0,37	0,15

N: Número de indivíduos; p*: teste t de *Student*, p[#] teste GLM ajustado para a presença do alelo $\epsilon 4$; DA: Doença de Alzheimer.

Adicionalmente, a expressão de *CNP* no tecido cerebral (sem a subdivisão de regiões) diferiu entre idosos saudáveis e pacientes com DA (Tabela 14; Figura 20). A expressão no tecido cerebral foi menor nos pacientes com DA do que nos idosos controle (QR=0,64). O teste GLM para correção da influência do alelo $\epsilon 4$ de *APOE* demonstrou diferença estatisticamente significativa entre pacientes com DA e idosos saudáveis. Entretanto, não foi observada diferença nas médias de metilação (p=0,45) (Tabela 15) e em CpGs específicas do promotor de *CNP* entre os dois grupos de análise (Anexo 10).

Tabela 14: Expressão do gene *CNP* em tecido cerebral de pacientes com Doença de Alzheimer e de idosos saudáveis.

Grupo	N	2 ^{-ΔCT} Médio	Desvio padrão	p*	p [#]	QR
Idosos Saudáveis	26	6,46	2,96			1
Pacientes com DA	32	4,12	2,85	0,003	0,001	0,45

N: Número de indivíduos; p*: teste t de *Student*; p[#]: teste GLM ajustado para a presença do alelo ε4; DA: Doença de Alzheimer; QR: Quantificação relativa em relação aos idosos.

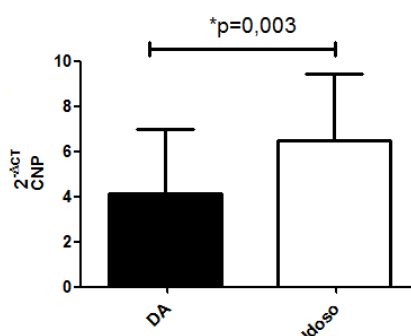


Figura 19: Expressão *CNP* em tecido cerebral em pacientes com Doença de Alzheimer e em idosos saudáveis. Comparação dos valores de 2^{-ΔCT} do gene *CNP* no tecido cerebral de pacientes com Doença de Alzheimer e de idosos saudáveis. * Comparação entre os grupos utilizando teste t de *Student*. DA: Doença de Alzheimer.

Tabela 15: Metilação do gene *CNP* no tecido cerebral de pacientes com Doença de Alzheimer e de idosos saudáveis.

Grupo	N	Média de metilação	Desvio padrão	p*	p [#]
Idosos Saudáveis	29	0,04	0,01		
Pacientes com DA	35	0,03	0,01	0,45	0,76

* Análises de teste t de *Student* comparando pacientes com DA e idosos saudáveis. N: Número de indivíduos; p: teste t de *Student*, DA: Doença de Alzheimer.

4.1.2.3 Comparação da expressão e metilação entre sangue periférico e tecido cerebral

Aa expressão do gene *CNP* diferiu entre amostras de sangue periférico e de tecido cerebral tanto para o grupo de idosos saudáveis, quanto para o grupo de pacientes com DA (Tabela 16; Figuras 20 A e B). O teste GLM demonstrou que as diferenças estatísticas entre sangue e cérebro de pacientes com DA e de idosos controle foram mantidas (Tabela 16).

Não foi observada correlação significativa na expressão de *CNP* entre o tecido cerebral e o sangue tanto em amostras de pacientes com DA ($R=-0,18$; $p=0,60$) quanto em idosos saudáveis ($R=0,38$; $p=0,38$).

Para o cálculo da QR foi utilizado o sangue periférico como referência em relação ao cérebro. O tecido cerebral apresentou menor expressão do gene *CNP* em relação ao sangue periférico em idosos saudáveis ($QR=0,19$) e em pacientes com DA ($QR=0,13$) (Tabela 16).

No grupo de pacientes com DA, não foi observada diferença na média de metilação do gene *CNP* entre sangue periférico e o tecido cerebral (Tabela 17). Adicionalmente, foi observada uma diferença pontual na sequência de *CNP* (CpG 7) que apresentou uma maior metilação no tecido cerebral em relação ao sangue periférico (Anexo 11).

No grupo de idosos saudáveis, não houve diferença na média de metilação entre sangue e tecido cerebral (Tabela 17). Os padrões de metilação foram bastante heterogêneos, sendo que alguns sítios CpGs apresentaram menor metilação no tecido cerebral em relação ao sangue (CpG 1,2,3,5, 6 e 10) e outros sítios apresentaram maior metilação no cérebro (CpG 7, 10, 13 e 14) (Anexo 11).

Tabela 16: Expressão do gene *CNP* em sangue periférico e tecido cerebral de pacientes com Doença de Alzheimer e de idosos saudáveis.

Tecido	Idosos Saudáveis						Pacientes com DA					
	N	2 ^{-ΔCT} Médio	Desvio padrão	p*	p [#]	QR	N	2 ^{-ΔCT} Médio	Desvio padrão	p*	p [#]	QR
Sangue	23	33,32	22,55	<0,001	0,04	0,19	34	33,91	23,07	<0,001	<0,001	0,13
Cérebro	26	6,46	2,96				32	4,12	2,85			

N: Número de indivíduos; p*: teste t de Student; p[#]: teste GLM ajustado para a presença do alelo ε4; DA: Doença de Alzheimer; QR: Quantificação relativa em relação ao sangue.

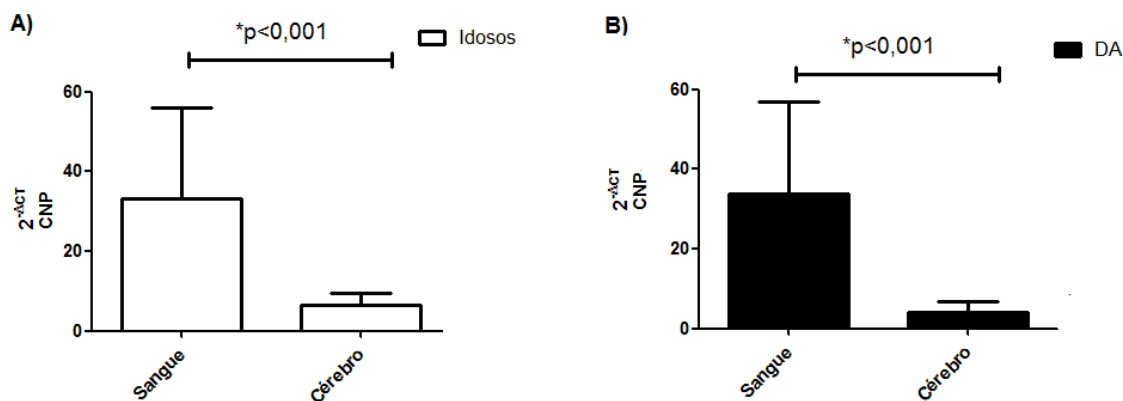


Figura 20: Expressão de *CNP* em sangue periférico e tecido cerebral. **A)** Comparação dos valores de $2^{-\Delta CT}$ do gene *CNP* entre o sangue periférico e o tecido cerebral de idosos saudáveis. **B)** Comparação dos valores de $2^{-\Delta CT}$ do gene *CNP* entre o sangue periférico e o tecido cerebral de pacientes com DA. DA: Doença de Alzheimer. * Comparação entre os grupos utilizando teste t de Student.

Tabela 17: Metilação do gene *CNP* em sangue periférico e tecido cerebral de pacientes com Doença de Alzheimer e de idosos saudáveis.

Tecido	Idosos Saudáveis					Pacientes com DA				
	N	Média de metilação	Desvio padrão	p*	p#	N	Média de metilação	Desvio padrão	p*	p#
Sangue	20	0,03	0,01	0,32	0,19	29,00	0,03	0,01	0,54	0,11
Cérebro	29	0,04	0,01			35,00	0,03	0,01		

N: Número de indivíduos; p*: teste t de Student; p#: teste GLM ajustado para a presença do alelo $\epsilon 4$; DA: Doença de Alzheimer.

4.1.3 HSPA8

4.1.3.1 Análise de expressão e metilação em sangue periférico

Para a análise de expressão de *HSPA8*, foram avaliadas 22, 22 e 32 amostras de sangue periférico dos grupos de jovens, de idosos saudáveis e de pacientes com DA, respectivamente. Para a avaliação da metilação, foram analisados 15, 13 e 24 amostras de sangue periférico dos grupos de jovens, de idosos saudáveis e de pacientes com DA, respectivamente.

A expressão de *HSPA8* no sangue periférico diferiu significativamente entre os três grupos analisados ($F=4,59$; $p=0,01$). A análise *post hoc* demonstrou uma diferença significativa entre o grupo de pacientes com DA e jovens. Não foi observada diferença significativa entre pacientes com DA e idosos saudáveis,

assim como entre o grupo de idosos saudáveis e jovens (Tabela 18; Figura 21). O teste GLM para correção da influência do alelo $\epsilon 4$ de *APOE* demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos, assim como a diferença entre os pacientes com DA e jovens, e entre pacientes com DA e idosos (Tabela 18).

O grupo de jovens saudáveis apresentou menor expressão do gene (QR=0,80) e o grupo de pacientes com DA apresentou uma maior expressão do gene (QR=1,51) em relação aos idosos saudáveis (Tabela 18).

Adicionalmente, foi observada uma diferença significativa na média de metilação entre os três grupos analisados ($F=4,58$, $p=0,01$). A análise *post hoc* demonstrou uma diferença significativa na média da metilação entre o grupo de pacientes com DA e idosos, e uma tendência de diferença entre idosos e jovens (Tabela 19).

O padrão de metilação de alguns sítios CpGs foi heterogêneo entre os grupos. O grupo de pacientes com DA apresentou tanto sítios CpGs mais metiladas (CpG 2, 3, 4, 13,14 e 22) quanto CpGs menos metiladas (CpGs 7,8,9,10,11,15 e 18) comparado a jovens e a idosos (Anexo 12). Os níveis de metilação de *HSPA8* foram extremamente baixos em todos os grupos, não superando 1% de metilação (Figura 22). Após a correção para a presença do alelo $\epsilon 4$ de *APOE* foi mantida a diferença significativa entre a metilação dos CpGs entre os grupos ($p=0,08$) (Tabela 19).

Tabela 18: Expressão do gene *HSPA8* em sangue periférico de pacientes com Doença de Alzheimer, de idosos saudáveis e de jovens.

Sangue	N	$2^{-\Delta Ct}$ Médio	Desvio Padrão	p^*	<i>Post hoc</i> *	$p^\#$	<i>Post hoc</i> #	QR
Jovens	22	0,64	0,52		DA x Idosos $p= 0,13$		DA x Idosos $p=0,01$	0,80
Idosos	22	0,80	0,53	0,01	Da x Jovens $p= 0,02$	0,004	DA x Jovens $p<0,001$	1,00
DA	32	1,21	0,91		Idosos x Jovens $p= 1,00$		Idosos x Jovens $p=0,85$	1,51

N: Número de indivíduos; p^* : teste ANOVA; *Post hoc**: *post hoc* do teste ANOVA; $p^\#$ teste GLM ajustado para a presença do alelo $\epsilon 4$; *Post hoc*#: *post hoc* do teste GLM ajustado para a presença de $\epsilon 4$; DA: Doença de Alzheimer; QR: Quantificação relativa em relação aos idosos.

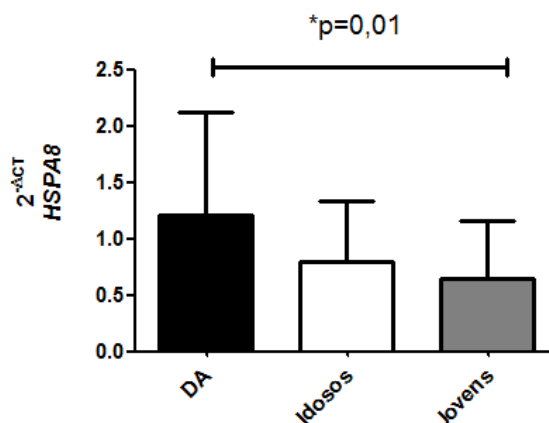


Figura 21: Expressão de *HSPA8* em sangue periférico. Comparação dos valores de $2^{\Delta CT}$ do gene *HSPA8* entre os grupos de jovens, idosos e pacientes com Doença de Alzheimer em sangue periférico. *Comparação entre os grupos utilizando teste ANOVA. DA: Doença de Alzheimer.

Tabela 19: Metilação do gene *HSPA8* em sangue periférico do grupo de pacientes com Doença de Alzheimer, de idosos saudáveis e de jovens.

Sangue	N	Média de metilação	Desvio padrão	p*	Post hoc*	p#	Post hoc#
Jovens	15	0,04	0,01		DA x Idosos p= 0,02		DA x Idosos p<0,001
Idosos	13	0,06	0,04	0,01	Da x Jovens p= 1,00	0,01	DA x Jovens p=1,00
DA	24	0,04	0,02		Idosos x Jovens p= 0,07		Idoso x Jovens p=0,003

N: Número de indivíduos; p*: teste ANOVA; *Post hoc**: *post hoc* do teste ANOVA; p# teste GLM ajustado para a presença do alelo $\epsilon 4$; *Post hoc*#: *post hoc* do teste GLM ajustado para a presença de $\epsilon 4$; DA: Doença de Alzheimer.

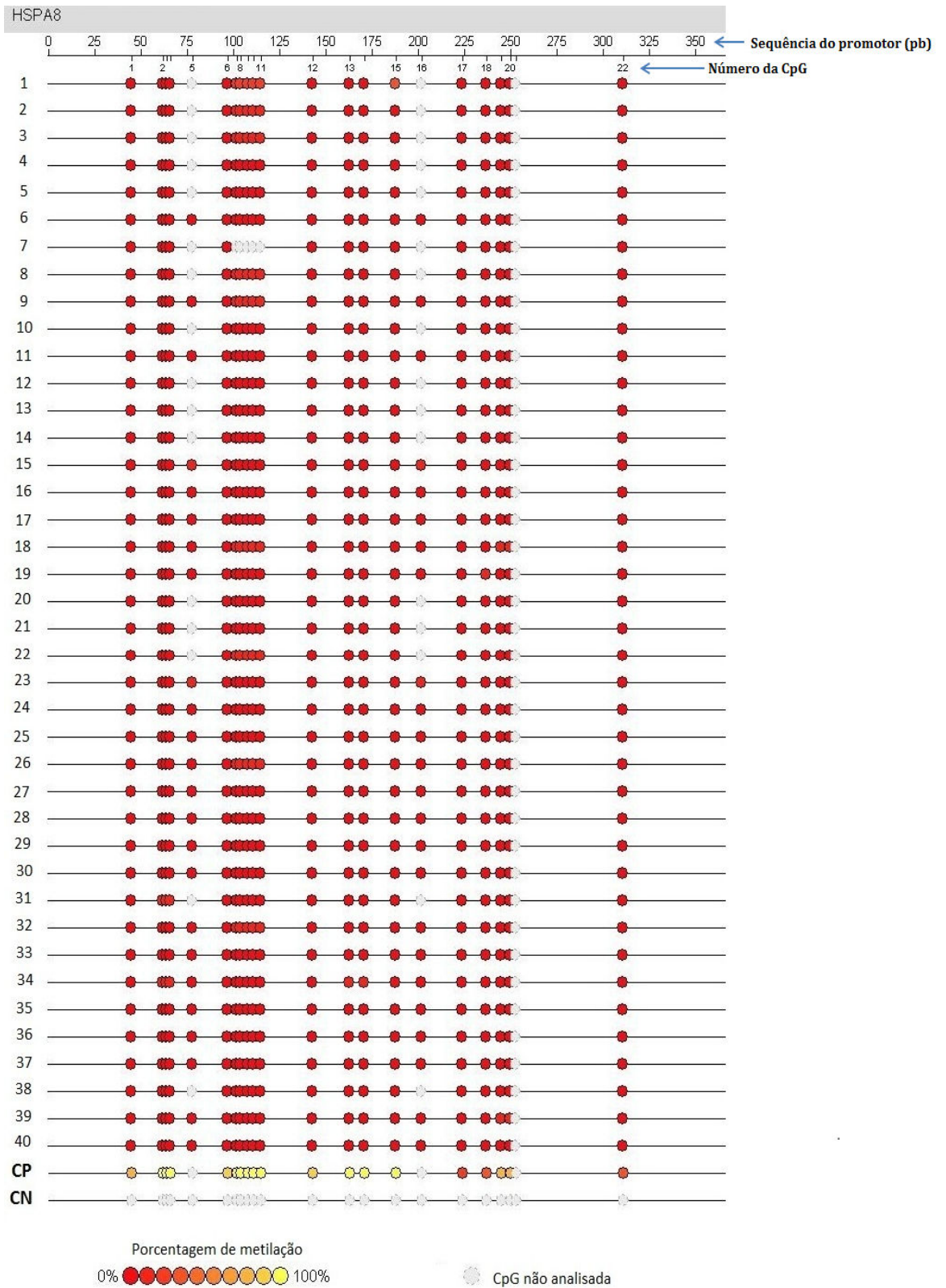


Figura 22: Epigrama ilustrativo resultante da análise de espectrometria de massa para o gene *HSPA8* de 40 amostras aleatoriamente dispostas dos indivíduos jovens, idosos e de pacientes com Doença de Alzheimer. CP: controle positivo de metilação – 100% metilado. CN: controle negativo da reação.

4.1.3.2 Análise de expressão e metilação em tecido cerebral

Em idosos saudáveis, foram avaliadas 6, 8 e 9 amostras de córtex entorrinal, córtex auditivo e hipocampo, respectivamente. No grupo de pacientes com DA, foram avaliadas 10, 10 e 11 amostras de córtices entorrinal e auditivo e de hipocampo, respectivamente.

Foi observada diferença de expressão de *HSPA8* no córtex auditivo, no córtex entorrinal e no hipocampo entre pacientes com DA e idosos (Tabela 20; Figura 23). Foi utilizado o grupo de idosos saudáveis como referência para o cálculo da QR. Todas as regiões cerebrais apresentaram níveis diminuídos, estatisticamente significantes, de expressão no grupo de pacientes com DA em relação ao grupo de idosos saudáveis (Tabela 20).

Apesar da expressão de *HSPA8* diferir nas três regiões estudadas, não houve diferença na metilação de sítios CpGs específicos (Anexo 13) nem na média de metilação nas três regiões entre idosos e pacientes com DA (Tabela 21). Foi observada hipometilação em todas as amostras, com porcentagens de metilação abaixo de 1% (Tabela 21, Figura 22).

Não houve diferença de expressão de *HSPA8* entre as três regiões cerebrais analisadas tanto no grupo de idosos ($F=0,23$; $p=0,80$) quanto no grupo de pacientes com DA ($F=0,97$, $p=0,39$) (Tabela 20). Adicionalmente, não foi observada diferença na média de metilação entre as três regiões no grupo de idosos saudáveis ($F=1,53$, $p=0,23$) e no grupo de pacientes com DA ($F=1,69$, $p=0,20$) (Tabela 21, Anexo 14).

Embora a média de metilação não tenha variado entre as três regiões estudadas, alguns sítios CpGs diferiram estatisticamente no grupo de pacientes com DA. Os sítios CpG 1 e 6 apresentaram menor metilação no córtex entorrinal quando comparados ao córtex auditivo e ao hipocampo. Por outro lado, os sítios CpG 15 e 18 apresentaram maior metilação no córtex entorrinal quando comparado ao córtex auditivo e ao hipocampo (Anexo 14).

Tabela 20: Expressão do gene *HSPA8* nas três regiões cerebrais de pacientes com Doença de Alzheimer e de idosos saudáveis.

Região Cerebral	Idosos Saudáveis			Pacientes com DA			p*	p [#]	QR
	N	2 ^{-ΔCt} Médio	Desvio padrão	N	2 ^{-ΔCt} Médio	Desvio padrão			
Córtex Entorrinal	6	9,39	3,66	10	3,03	1,89	0,004	0,004	0,32
Córtex Auditivo	8	10,01	4,73	10	3,17	1,85	<0,001	0,002	0,32
Hipocampo	9	8,84	1,93	11	4,13	2,15	<0,001	0,001	0,24

N: Número de indivíduos; p*: teste t de Student; p[#]: teste GLM ajustado para a presença do alelo ε4; DA: Doença de Alzheimer; QR: Quantificação relativa em relação aos idosos.

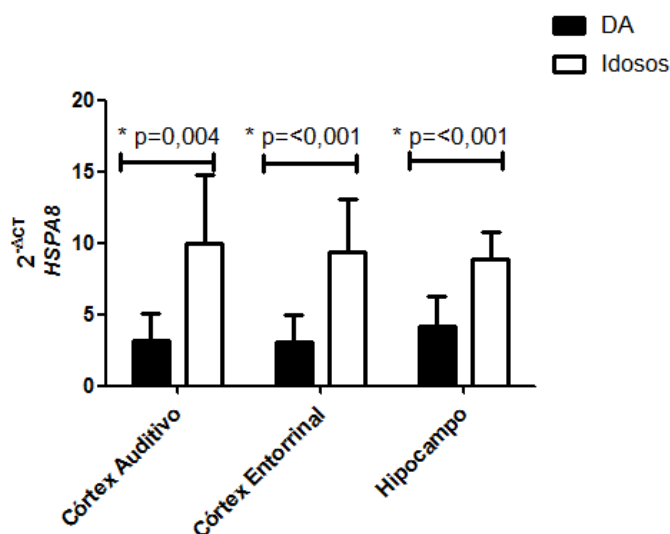


Figura 23: Expressão de *HSPA8* em tecido cerebral de pacientes com DA e idosos saudáveis. Comparação dos valores de 2^{-ΔCt} do gene *HSPA8* no córtex entorrinal, córtex auditivo e hipocampo entre o grupo de pacientes com Doença de Alzheimer e de idosos saudáveis. DA: Doença de Alzheimer.

Tabela 21: Metilação do gene *HSPA8* nas três regiões cerebrais de pacientes com Doença de Alzheimer e de idosos saudáveis.

Região Cerebral	Idosos Saudáveis			Pacientes com DA			p*	p [#]
	N	Média de metilação	Desvio padrão	N	Média de metilação	Desvio padrão		
Córtex Entorrinal	10	0,03	0,00	12	0,04	0,03	0,26	0,60
Córtex Auditivo	10	0,03	0,01	12	0,03	0,01	0,80	0,27
Hipocampo	10	0,03	0,00	12	0,03	0,01	0,08	0,04

N: Número de indivíduos; p*: teste t de Student; p[#]: teste GLM ajustado para a presença do alelo ε4; DA: Doença de Alzheimer.

A expressão de *HSPA8* no tecido cerebral (sem a subdivisão de regiões) diferiu significativamente entre idosos saudáveis e pacientes com DA

(Tabela 22; Figura 24). O valor de QR foi de 0,37, utilizando-se o grupo de idosos como referência. O teste GLM para correção da influência do alelo $\epsilon 4$ de *APOE* demonstrou diferença estatística entre os grupos de pacientes com DA e idosos ($p < 0,001$). Entretanto, não foi observada diferença nas médias de metilação (Tabela 18) e em CpGs específicas (Anexo 15) que pudessem explicar a diminuição da expressão desse gene nos pacientes com DA.

Tabela 22: Expressão do gene *HSPA8* em tecido cerebral de pacientes com Doença de Alzheimer e de idosos saudáveis.

Grupo	N	$2^{-\Delta CT}$ Médio	Desvio padrão	p^*	$p^\#$	QR
Idosos Saudáveis	23	9,39	3,43	<0,001	<0,001	1,00
Pacientes com DA	31	3,47	1,97			0,37

N: Número de indivíduos; p^* : teste t de *Student*; $p^\#$: teste GLM ajustado para a presença do alelo $\epsilon 4$; DA: Doença de Alzheimer; QR: Quantificação relativa em relação aos idosos.

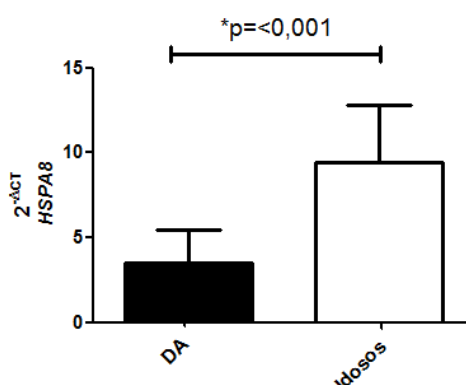


Figura 24: Expressão de *HSPA8* em tecido cerebral em pacientes com Doença de Alzheimer e em idosos saudáveis. Comparação dos valores de $2^{-\Delta CT}$ do gene *HSPA8* no tecido cerebral de pacientes com Doença de Alzheimer e de idosos saudáveis. DA: Doença de Alzheimer. * Comparação entre os grupos utilizando-se teste t de *Student*.

Tabela 23: Metilação do gene *HSPA8* no tecido cerebral de pacientes com Doença de Alzheimer e de idosos saudáveis.

Grupo	N	Média de metilação	Desvio padrão	p^*	$p^\#$
Idosos Saudáveis	30	0,03	0,01	0,14	0,11
Pacientes com DA	36	0,04	0,02		

N: Número de indivíduos; p^* : teste t de *Student* comparando pacientes com DA e idosos saudáveis; DA: Doença de Alzheimer.

4.1.3.3 Comparação da expressão e metilação entre sangue periférico e tecido cerebral

A expressão do gene *HSPA8* diferiu significativamente entre amostras de sangue periférico e de tecido cerebral tanto para o grupo de idosos saudáveis quanto para o grupo de pacientes com DA (Tabela 24; Figuras 25 A e B). O teste GLM com ajuste para o alelo $\epsilon 4$ de *APOE* manteve a diferença estatística entre sangue periférico e tecido cerebral no grupo de idosos, porém, no grupo de pacientes com DA a diferença entre os dois tecidos deixou de existir (Tabela 24).

Não foi observada correlação significativa na expressão de *HSPA8* entre o tecido cerebral e o sangue tanto em amostras de pacientes com DA ($R=0,31$; $p=0,32$) quanto em idosos saudáveis ($R=-0,18$; $p=0,67$).

Para o cálculo da QR, foi utilizado o sangue periférico como referência em relação ao cérebro. O tecido cerebral apresentou maior expressão do gene *HSPA8* em relação ao sangue periférico para em pacientes com DA ($QR=2,87$) e em idosos saudáveis ($QR=11,72$) (Tabela 24).

No grupo de pacientes com DA, não foi observada diferença na média de metilação do gene *HSPA8* entre sangue periférico e o tecido cerebral (Tabela 25). Adicionalmente, foi observada uma diferença pontual na sequência de *HSPA8* (CpG 19 e 20), com menor metilação desses sítios CpGs no tecido cerebral em relação ao sangue periférico (Anexo 16). No grupo de idosos saudáveis, os padrões de metilação foram bastante heterogêneos. Houve diferença na média de metilação entre sangue e tecido cerebral (Tabela 25). Os sítios CpG 1,2,3,4,13 e 14 apresentaram maior metilação no tecido cerebral em relação ao sangue. Já os sítios CpG 7, 8, 9, 10, 11 apresentaram menor metilação no tecido cerebral (Anexo 16).

Tabela 24: Expressão do gene *HSPA8* em sangue periférico e tecido cerebral de pacientes com Doença de Alzheimer e de idosos saudáveis.

Tecido	Idosos Saudáveis						Pacientes com DA					
	N	$2^{-\Delta CT}$ Médio	Desvio padrão	p^*	$p^\#$	QR	N	$2^{-\Delta CT}$ Médio	Desvio padrão	p^*	$p^\#$	QR
Sangue	22	0,80	0,53	<0,001	<0,001	11,72	32	1,21	0,91	<0,001	<0,001	2,87
Cérebro	23	9,39	3,43				31	3,47	1,97			

N: Número de indivíduos; p^* : teste t de Student; $p^\#$: teste GLM ajustado para a presença do alelo $\epsilon 4$; DA: Doença de Alzheimer; QR: Quantificação relativa em relação ao sangue.

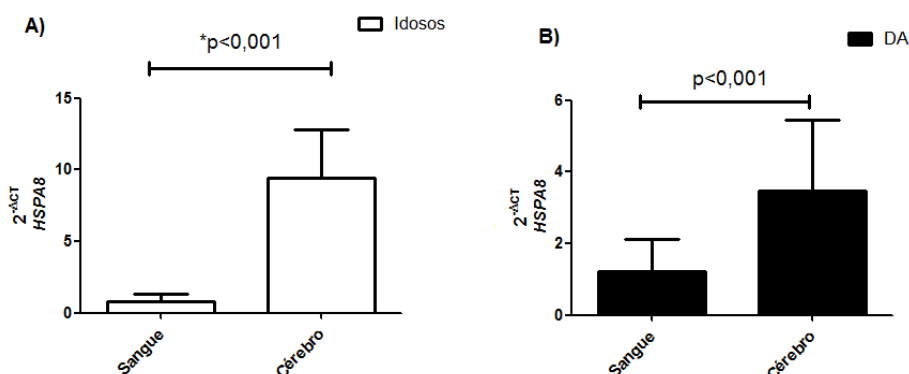


Figura 25. Expressão de *HSPA8* em sangue periférico e tecido cerebral. **A)** Comparação dos valores de $2^{-\Delta CT}$ do gene *HSPA8* entre o sangue periférico e o tecido cerebral de idosos saudáveis. **B)** Comparação dos valores de $2^{-\Delta CT}$ do gene *HSPA8* entre o sangue periférico e o tecido cerebral de pacientes com DA. DA: Doença de Alzheimer. * Comparação entre os grupos utilizando teste t de Student.

Tabela 25: Metilação do gene *HSPA8* em sangue periférico e tecido cerebral de pacientes com Doença de Alzheimer e de idosos saudáveis.

Tecido	Idosos Saudáveis					Pacientes com DA				
	N	Média de metilação	Desvio padrão	p*	p#	N	Média de metilação	Desvio padrão	p*	p#
Sangue	13	0,06	0,04	0,01	<0,001	24	0,04	0,02	0,55	0,56
Cérebro	30	0,03	0,01			36	0,04	0,02		

N: Número de indivíduos; p*: teste t de Student comparando pacientes com DA e idosos saudáveis, DA: Doença de Alzheimer.

4.1.4 HSPA9

4.1.4.1 Análise de expressão e metilação em sangue periférico

Para a análise de expressão do gene *HSPA9* foram avaliadas 22, 23 e 32 amostras de sangue periférico dos grupos de jovens, de idosos saudáveis e de pacientes com DA, respectivamente. Na avaliação da metilação, foram analisados 18, 18 e 29 amostras de sangue periférico dos grupos de jovens, de idosos saudáveis e de pacientes com DA, respectivamente.

A expressão de *HSPA9* no sangue periférico diferiu entre os três grupos analisados (F=5,05; p=0,01). A análise *post hoc* demonstrou diferença significativa entre o grupo de pacientes com DA e jovens. Não foi observada

diferença significativa entre pacientes com DA e idosos saudáveis, e entre o grupo de idosos saudáveis e jovens (Tabela 26; Figura 26). O teste GLM para correção da influência do alelo $\epsilon 4$ de *APOE* demonstrou uma diferença estatística entre os grupos, mantendo as diferenças significantes entre o grupo de pacientes com DA e jovens e entre pacientes com DA e idosos saudáveis (Tabela 26).

Para o cálculo da QR, foi utilizado o grupo de idosos como referência. O grupo de jovens saudáveis e o grupo de pacientes com DA apresentaram uma QR de 0,79 e 1,46, respectivamente. O grupo de jovens saudáveis apresentou menor expressão do gene *HSPA9* em relação ao grupo de idosos, enquanto que o grupo de pacientes com DA apresentou maior expressão gênica quando comparado aos idosos (Tabela 26).

Adicionalmente, não foi observada diferença na média de metilação entre os três grupos analisados ($F=0,29$, $p=0,75$) (Tabela 27). No entanto, foi observada uma diferença pontual na sequência de *HSPA9* em sítios CpG seqüenciais (CpG 1,2,3,5,6,7,8,9,10), como uma menor metilação no grupo de pacientes com DA em relação aos dois grupos controles (Anexo 17). Como para os demais genes, *HSPA9* apresentou níveis de metilação baixos em todos os grupos, não superando 1% de metilação (Figura 27).

Tabela 26: Expressão do gene *HSPA9* em sangue periférico de pacientes com Doença de Alzheimer, de idosos saudáveis e de jovens.

Sangue	N	$2^{-\Delta Ct}$ Médio	Desvio Padrão	p*	Post hoc*	p#	Post hoc#	QR
Jovens	22	5,57	5,31		DA x Idosos p= 0,12		DA x Idosos p=0,11	0,79
Idosos	22	7,06	3,37	0,01	Da x Jovens p= 0,01	0,01	DA x Jovens p=0,01	1
DA	32	10,28	6,90		Jovens x Idosos p= 1,00		Idosos x Jovens p=1,00	1,46

N: Número de indivíduos; p*: teste ANOVA; *Post hoc**: *post hoc* do teste ANOVA; p# teste GLM ajustado para a presença do alelo $\epsilon 4$; *Post hoc*#: *post hoc* do teste GLM ajustado para a presença de $\epsilon 4$; DA: Doença de Alzheimer; QR: Quantificação relativa em relação aos idosos.

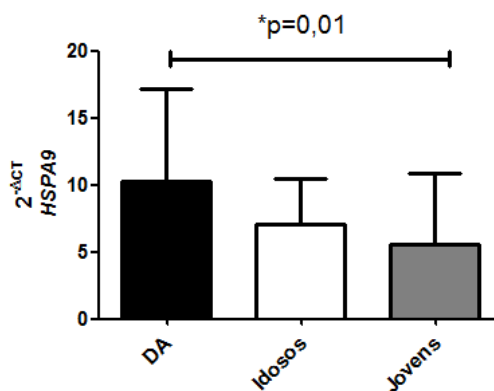


Figura 26: Expressão de *HSPA9* em sangue periférico. Comparação dos valores de $2^{-\Delta CT}$ do gene *HSPA9* entre os grupos de jovens, idosos e pacientes com Doença de Alzheimer em sangue periférico. *Comparação entre os grupos utilizando teste ANOVA. DA: Doença de Alzheimer.

Tabela 27: Metilação do gene *HSPA9* em sangue periférico de pacientes com Doença de Alzheimer, de idosos saudáveis e de jovens.

Sangue	N	Média de metilação	Desvio padrão	p*	p#
Jovens	18	0,05	0,01		
Idosos	18	0,05	0,01	0,75	0,46
DA	29	0,05	0,01		

N: Número de indivíduos; p*: teste ANOVA; p# teste GLM ajustado para a presença do alelo $\epsilon 4$; DA: Doença de Alzheimer.

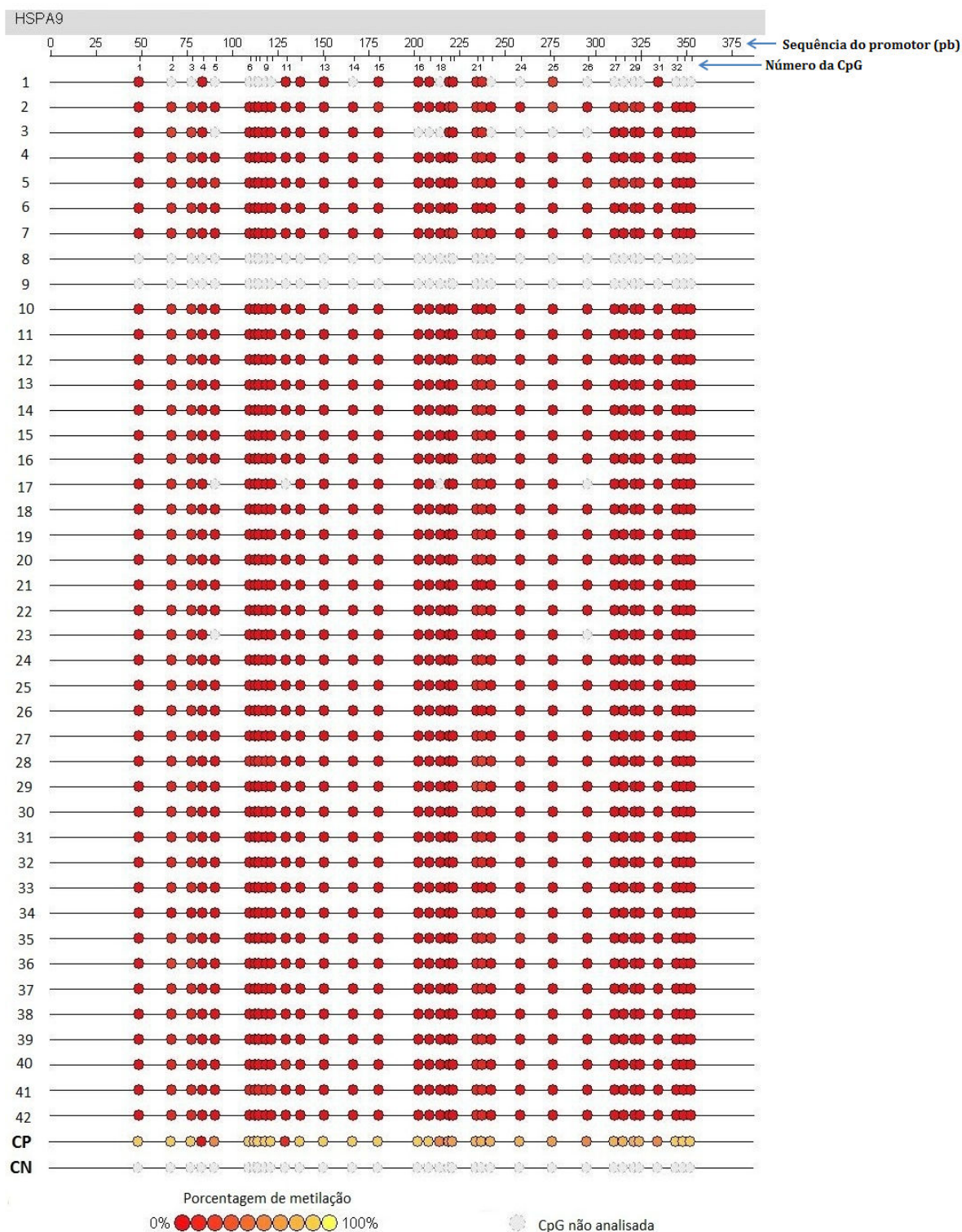


Figura 27: Epigramma ilustrativo resultante da análise de espectrometria de massa para o gene *HSPA9* de 42 amostras aleatoriamente dispostas dos indivíduos jovens, idosos e de pacientes com Doença de Alzheimer. CP: controle positivo de metilação – 100% metilado. CN: controle negativo da reação.

4.1.4.2 Análise de expressão e metilação em tecido cerebral

Na análise de metilação e expressão do gene *HSPA9*, foram analisadas 6, 9 e 9 amostras de córtex entorrinal, de córtex auditivo e de hipocampo, respectivamente, do grupo de idosos saudáveis. No grupo de pacientes com DA, foram avaliadas 10, 11 e 11 amostras de córtices entorrinal e auditivo e de hipocampo, respectivamente.

Foi observada diferença de expressão de *HSPA9* no córtex auditivo, no córtex entorrinal e no hipocampo entre pacientes com DA e idosos controles (Tabela 28; Figura 28). Todas as regiões cerebrais apresentaram níveis diminuídos de expressão, estatisticamente significantes, no grupo de pacientes com DA em relação ao grupo de idosos saudáveis (Tabela 28).

Apesar de *HSPA9* expressar-se diferentemente entre os grupos nas três regiões cerebrais analisada, não foi observada uma diferença na média de metilação nessas regiões entre pacientes com DA e idosos saudáveis (Tabela 29). A metilação dos sítios CpGs 14, 19 e 20 diferiram entre idosos e pacientes com DA (Anexo 18). Foi observada hipometilação em todas as amostras, com porcentagens de metilação abaixo de 1% (Tabela 29, Figura 27).

Não houve diferença de expressão entre as três regiões cerebrais analisadas (córtices entorrinal e auditivo e hipocampo) tanto no grupo de idosos ($F=1,13$; $p=0,34$) quanto no grupo de pacientes com DA ($F=0,64$, $p=0,53$). Adicionalmente, não foi observada diferença na média de metilação entre as três regiões nos pacientes com DA e nos idosos controles. Houve diferença de metilação no sítio CpG 21 entre o córtex auditivo e o hipocampo no grupo de pacientes com DA (Anexo 19).

Tabela 28: Expressão do gene *HSPA9* nas três regiões cerebrais de pacientes com Doença de Alzheimer e de idosos saudáveis.

Região Cerebral	Idosos Saudáveis			Pacientes com DA			p*	p [#]	QR
	N	2 ^{-ΔCT} Médio	Desvio padrão	N	2 ^{-ΔCT} Médio	Desvio padrão			
Córtex Entorrinal	6	35,48	15,69	10	8,31	9,26	0,001	<0,001	0,23
Córtex Auditivo	9	48,54	21,43	11	9,53	16,56	<0,001	<0,001	0,20
Hipocampo	9	47,17	12,02	11	8,08	8,09	<0,001	<0,001	0,17

N: Número de indivíduos; p*: teste t de Student; p[#]: teste GLM ajustado para a presença do alelo ε4; DA: Doença de Alzheimer; QR: Quantificação relativa em relação aos idosos.

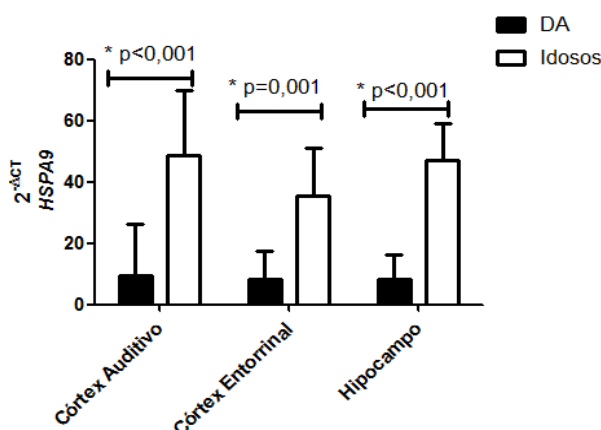


Figura 28. Expressão de *HSPA9* em tecido cerebral de pacientes com DA e idosos saudáveis. Comparação dos valores de 2^{-ΔCT} do gene *HSPA9* no córtex entorrinal, córtex auditivo e hipocampo entre o grupo de pacientes com Doença de Alzheimer e de idosos saudáveis. * Comparação entre os grupos utilizando teste t de Student. DA: Doença de Alzheimer.

Tabela 29: Metilação do gene *HSPA9* nas três regiões cerebrais de pacientes com Doença de Alzheimer e de idosos saudáveis.

Região Cerebral	Idosos Saudáveis			Pacientes com DA			p*	p [#]
	N	Média de metilação	Desvio padrão	N	Média de metilação	Desvio padrão		
Córtex Entorrinal	10	0,04	0,00	12	0,04	0,01	0,26	0,49
Córtex Auditivo	10	0,04	0,01	11	0,04	0,01	0,81	0,15
Hipocampo	10	0,04	0,01	12	0,04	0,01	0,11	0,05

N: Número de indivíduos; p*: teste t de Student; p[#]: teste GLM ajustado para a presença do alelo ε4; DA: Doença de Alzheimer.

Adicionalmente, a expressão de *HSPA9* no tecido cerebral (sem a subdivisão de regiões) diferiu significativamente entre idosos saudáveis e pacientes com DA (Tabela 30; Figura 29). O valor de QR foi de 0,19, utilizando o grupo de idosos como referência. O teste GLM para ajuste pela presença do alelo ε4 de

APOE demonstrou diferença estatística entre os grupos de pacientes com DA e idosos. No entanto, não foi observada diferença nas médias de metilação (Tabela 31) e em CpGs específicas que pudessem explicar a diminuição da expressão desse gene nos pacientes com DA (Anexo 20).

Tabela 30: Expressão do gene *HSPA9* em tecido cerebral de pacientes com Doença de Alzheimer e de idosos saudáveis.

Grupo	N	2 ^{-ΔCT} Médio	Desvio padrão	p*	p [#]	QR
Idosos Saudáveis	24	44,76	17,14			1,00
Pacientes com DA	32	8,65	11,61	<0,001	<0,001	0,19

N: Número de indivíduos; p*: teste t de *Student*; p[#]: teste GLM ajustado para a presença do alelo ε4; DA: Doença de Alzheimer; QR: Quantificação relativa em relação aos idosos.

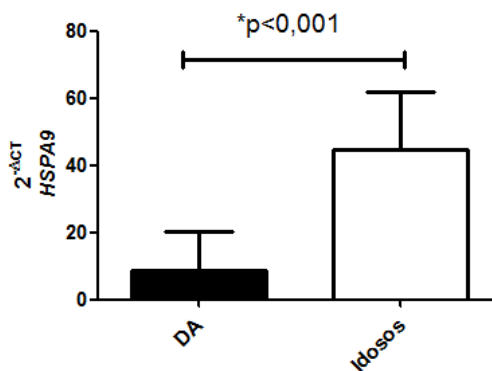


Figura 29. Expressão de *HSPA9* em tecido cerebral em pacientes com Doença de Alzheimer e em idosos saudáveis. Comparação dos valores de 2^{-ΔCT} do gene *HSPA9* no tecido cerebral de pacientes com Doença de Alzheimer e de idosos saudáveis. * Comparação entre os grupos utilizando teste t de *Student*. DA: Doença de Alzheimer.

Tabela 31: Metilação do gene *HSPA9* no tecido cerebral de pacientes com Doença de Alzheimer e de idosos saudáveis.

Grupo	N	Média de metilação	Desvio padrão	p*	p [#]
Idosos Saudáveis	30	0,04	0,01		
Pacientes com DA	35	0,04	0,01	0,09	0,02

N: Número de indivíduos; p*: teste t de *Student*; p[#]: teste GLM ajustado para a presença do alelo ε4; DA: Doença de Alzheimer

4.1.4.3 Comparação da expressão e metilação entre sangue periférico e tecido cerebral

A expressão do gene *HSPA9* diferiu significativamente entre sangue periférico e tecido cerebral no grupo de idosos saudáveis, porém não houve diferença significativa entre esses dois tecidos no grupo de pacientes com DA (Tabela 32; Figuras 30 A e B). O teste GLM utilizando o alelo $\epsilon 4$ de *APOE* como variável de interação também demonstrou uma diferença estatística entre sangue periférico e tecido cerebral no grupo de idosos, e não foi observada diferença entre os dois tecidos no grupo de pacientes com DA (Tabela 32).

Não foi observada correlação significativa na expressão de *HSPA9* entre o tecido cerebral e o sangue tanto em amostras de pacientes com DA ($R=0,14$; $p=0,66$) quanto em idosos saudáveis ($R=0,10$; $p=0,81$).

Para o cálculo da QR, foi utilizado o sangue periférico como referência em relação ao cérebro. O tecido cerebral apresentou maior expressão do gene *HSPA9* em relação ao sangue periférico no grupo de idosos saudáveis ($QR=6,34$), porém, no grupo de pacientes com DA, foi observada uma expressão reduzida ($QR=0,84$) (Tabela 32).

No grupo de pacientes com DA, não foi observada diferença na média de metilação do gene *HSPA9* entre sangue periférico e o tecido cerebral (Tabela 33). Adicionalmente, foi observada uma diferença pontual na sequência do gene (CpGs 6, 7, 8, 9, 10, 23 e 24), com uma maior metilação no tecido cerebral em relação ao sangue periférico (Anexo 21).

No grupo de idosos, foi observada diferença na média de metilação do gene *HSPA9* entre sangue periférico e o tecido cerebral (Tabela 33). O padrão de metilação dos tecidos foi bastante heterogêneo, apresentando diferença em alguns sítios CpGs. Os sítios CpG 1 e 11 apresentaram menor metilação no tecido cerebral em relação ao sangue. Já os sítios CpG 19, 20, 21 e 22 apresentaram maior metilação no cérebro (Anexo 21).

Tabela 32: Expressão do gene *HSPA9* em sangue periférico e tecido cerebral de pacientes com Doença de Alzheimer e de idosos saudáveis.

Tecido	Idosos Saudáveis					Pacientes com DA						
	N	2 ^{-ΔCT} Médio	Desvio padrão	p*	p#	QR	N	2 ^{-ΔCT} Médio	Desvio padrão	p*	p#	QR
Sangue	23	7,06	3,37	<0,001	0,001	6,34	32	10,28	6,90	0,50	0,02	0,84
Cérebro	24	44,76	17,14				32	8,65	11,61			

N: Número de indivíduos; p*: teste t de Student; p#: teste GLM ajustado para a presença do alelo ε4; DA: Doença de Alzheimer; QR: Quantificação relativa em relação ao sangue.

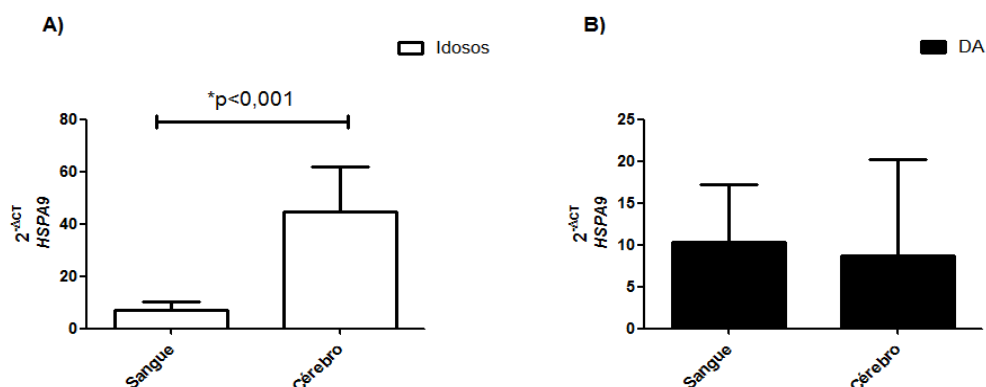


Figura 30: Expressão de *HSPA9* em sangue periférico e tecido cerebral. **A)** Comparação dos valores de 2^{-ΔCT} do gene *HSPA9* entre o sangue periférico e o tecido cerebral de idosos saudáveis. **B)** Comparação dos valores de 2^{-ΔCT} do gene *HSPA9* entre o sangue periférico e o tecido cerebral de pacientes com DA. DA: Doença de Alzheimer. * Comparação entre os grupos utilizando teste t de Student.

Tabela 33: Metilação do gene *HSPA9* em sangue periférico e tecido cerebral de pacientes com Doença de Alzheimer e de idosos saudáveis.

Tecido	Idosos Saudáveis					Pacientes com DA				
	N	Média de metilação	Desvio padrão	p*	p#	N	Média de metilação	Desvio padrão	p*	p#
Sangue	18	0,05	0,01	<0,001	0,01	29	0,05	0,01	0,06	0,11
Cérebro	30	0,04	0,01			35	0,04	0,01		

N: Número de indivíduos; p*: teste t de Student; p#: teste GLM ajustado para a presença do alelo ε4; DA: Doença de Alzheimer.

4.2 Análise da metilação de sequências *LINE1*

Para a análise de metilação global, foram avaliadas 8, 8 e 9 amostras de córtex entorrinal, de córtex auditivo e de hipocampo, respectivamente, do grupo

de idosos saudáveis. No grupo de pacientes com DA, foram avaliadas 10, 10 e 12 amostras dos córtices entorrinal e auditivo e do hipocampo, respectivamente.

No presente estudo, a metilação global no córtex auditivo não diferiu entre pacientes com DA e idosos saudáveis ($p=0,12$). Entretanto, foi observada uma diferença nas médias de metilação do córtex entorrinal ($p<0,001$) e do hipocampo ($p=0,03$) quando os dois grupos foram comparados (Tabela 34; Figura 31).

Na análise de alelos de *APOE*, foi observada associação do alelo $\epsilon 4$ com os grupos, por isso foi realizado o teste GLM utilizando o alelo $\epsilon 4$ de como variável de interação para ajustar os resultados significantes observados. Após a correção, foi observada diferença significativa no córtex auditivo, no córtex entorrinal e no hipocampo entre pacientes com DA e idosos saudáveis (Tabela 34).

A metilação de *LINE1* diferiu significativamente entre as três regiões cerebrais no grupo de idosos saudáveis ($F=20,46$, $p<0,001$) e em pacientes com DA ($F=12,02$, $p<0,001$).

No grupo de idosos, o teste *post hoc* demonstrou uma diferença significativa entre o córtex entorrinal e o córtex auditivo ($p<0,001$) e entre o córtex entorrinal e o hipocampo ($p=0,001$). Foi observado que a metilação de *LINE1* era menor no córtex entorrinal do que nas demais regiões cerebrais (Tabela 34). Após a correção pelo presença do alelo $\epsilon 4$, foi observada uma diferença significativa entre o córtex entorrinal e o córtex auditivo ($p<0,001$), entre o córtex entorrinal e o hipocampo ($p=0,001$) e entre o córtex auditivo e o hipocampo ($p=0,02$).

No grupo de pacientes com DA, foi observa uma diferença significativa entre o hipocampo e o córtex auditivo ($p<0,001$) e entre o hipocampo e o córtex entorrinal ($p=0,01$), com o hipocampo apresentando menos metilação global que as demais regiões (Tabela 34, Figura 32). Após a correção utilizando o alelo $\epsilon 4$ de *APOE* como variável de interação, foram mantidas as diferenças significantes nas médias de metilação entre o hipocampo e o córtex auditivo ($p<0,001$) e entre o hipocampo e o córtex entorrinal ($p<0,001$).

Tabela 34: Médias de metilação de *LINE1* nas três regiões cerebrais de pacientes com DA e idosos saudáveis.

Região Cerebral	Idosos saudáveis			Pacientes com DA			p*	p [#]
	N	% Média de metilação	Desvio padrão	N	% Média de metilação	Desvio padrão		
Córtex Entorrinal	8	77,48	2,52	10	83,13	2,77	<0,001	<0,001
Córtex Auditivo	8	85,36	1,96	10	84,34	0,81	0,12	0,03
Hipocampo	9	82,92	2,94	12	79,61	2,94	0,03	0,01

N: Número de indivíduos; p*: teste t de Student; p[#]: teste GLM ajustado para a presença do alelo ε4; DA: Doença de Alzheimer.

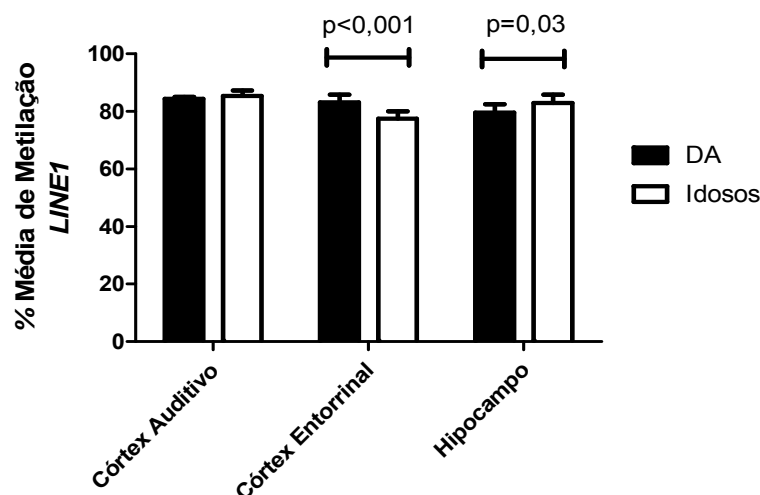


Figura 31: Porcentagens médias de metilação de *LINE1* entre pacientes com Doença de Alzheimer e idosos saudáveis. Valores de p referentes ao teste t de *Student* para comparação entre os dois grupos de estudo.

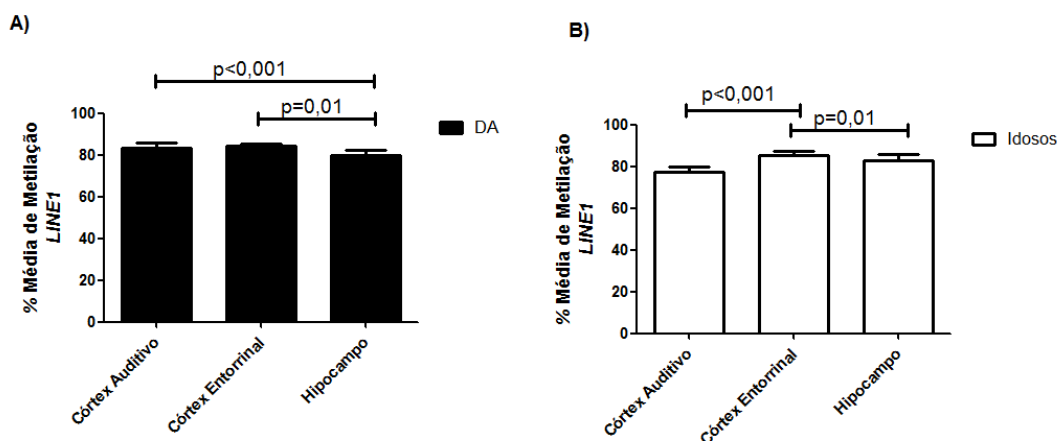


Figura 32: Porcentagens médias de metilação de *LINE1* em córtex auditivo, córtex entorrinal e hipocampo de (A) pacientes com Doença de Alzheimer e (B) do grupo de idosos saudáveis. Valores de p referentes ao test. t ANOVA para comparação entre as regiões cerebrais apresentadas.

5 DISCUSSÃO

5.1 *DPYSL2*

O gene *DPYSL2* codifica uma proteína envolvida na diferenciação neuronal e na formação de axônios, sendo que, alterações na expressão protéica são apontadas como indutoras de anormalidades de neurodesenvolvimento (92).

Em nosso estudo, observamos uma maior expressão de *DPYSL2* em sangue periférico de jovens em relação aos grupos de pacientes com DA e idosos saudáveis (Tabela 4). Em sangue periférico, a expressão de *DPYSL2* pode estar associada ao processo de envelhecimento e aparentemente não apresenta influência na DA, uma vez que, não houve diferença entre o grupo de idosos e pacientes. Nossos achados corroboram o estudo de Zhao e colaboradores (2006), que investigaram a expressão de RNAm de *DPYSL2* em linfócitos de pacientes com esquizofrenia e observou correlação negativa da expressão com idade (92).

Estudo de Rouzaut e colaboradores (2000), descreveu a expressão de *DPYSL2* em cultura de células mononucleares do sangue periférico, com aumento e diminuição de RNAm durante a diferenciação celular do sistema imune. A expressão do gene variou em intervalos, de acordo com a inserção de peptídeos indutores de diferenciação, sugerindo uma participação de *DPYSL2* como modulador de sinais extracelulares para a diferenciação celular (127).

É possível que a maior expressão de *DPYSL2* nos indivíduos jovens observada em nosso estudo esteja relacionada a uma maior diferenciação celular e maior potencial de proliferação do sistema imunológico destes indivíduos (128).

Devido à ausência de sucesso na análise de espectrometria de massa, não foi possível avaliar se a diferença na expressão do gene *DPYSL2*, observada entre os grupos estava associada a um controle epigenético.

No tecido cerebral, estudos que investigaram a expressão protéica de DPYSL2 apresentaram resultados conflitantes. Estudo de Johnston e colaboradores (2000) relataram a diminuição protéica no córtex frontal de pacientes com esquizofrenia, doença bipolar e depressão maior. Por outro lado, estudo de Edgar e colaboradores (2000), descreveram o aumento desta proteína no hipocampo destes pacientes. É possível que as diferenças entre a expressão nos estudos possa ser decorrente de uma heterogeneidade entre as diferentes regiões cerebrais estudadas (95, 96).

Na avaliação do tecido cerebral, foi observada diferença estatística entre o cérebro de idosos e pacientes com DA quando avaliamos o tecido sem subdividi-lo por regiões. Quando analisamos as regiões separadamente, embora sem significância estatística, foi observada uma menor expressão de *DPYSL2* nas três regiões estudadas (córtex entorrinal, hipocampo e córtex auditivo) em relação aos controles idosos (Tabela 5). Estes achados corroboram os estudos de proteômica que relataram a diminuição dos níveis de *DPYSL2* no hipocampo de e em lobo temporal de pacientes com DA em relação a controles (97, 98).

Embora tenha sido observada diferença nos níveis de proteína, o estudo de Lubec e colaboradores (1999) não relatou alterações significantes entre a expressão de RNAm de *DPYSL2* nas diferentes regiões cerebrais estudadas, assim como em nosso estudo (97).

Não foi observada diferença na quantificação da metilação de *DPYSL2* no tecido cerebral agrupado, nem nas três regiões cerebrais analisadas separadamente. As porcentagens de metilação nos dinucleotídeos CpGs foram baixas, e apresentaram níveis que não parecem suficientes para inibir a ação do gene e controlar os níveis de proteína.

Alguns eventos pós traducionais são apontados como reguladores da atividade protéica de DPYSL2 na DA. Cole e colaboradores (2007) observaram a hiperfosforilação de DPYSL2 em córtex e hipocampo de humanos e de modelo animal para DA (129). Além disso, estudos de Sultana e colaboradores (2006) relataram o aumento da oxidação desta proteína na

doença como um dos fatores responsáveis pela diminuição protéica observada (98).

Na análise entre tecidos, foi observada maior expressão do gene *DPYSL2* no sangue periférico do que no tecido cerebral, tanto no grupo de pacientes com DA como em idosos saudáveis. Esse padrão de expressão não corrobora a maioria dos estudos observados na literatura, agrupados em base de dados de expressão como *TIGER Database Gene View* (130), que descreveram uma maior expressão de *DPYSL2* no cérebro em relação ao sangue.

A observação da diferença de expressão entre o sangue periférico e o tecido cerebral era prevista devido a suas peculiaridades e funções distintas. Por isso, foi avaliada a presença de correlação entre os dois tecidos para verificar se estes se comportavam da mesma forma, e se seria possível utilizar um tecido periférico como preditor da expressão deste gene no cérebro. Tal correlação não foi observada e, portanto não podemos inferir o comportamento de *DPYSL2* no cérebro baseando-se na expressão do sangue.

5.2 *CNP*

É proposto que a oligodendroglia, a principal célula formadora de mielina no SNC, esteja afetada na DA. O gene *CNP* codifica a proteína responsável por aproximadamente 4% do conteúdo de proteínas miélicas, sendo que, por muito tempo foi considerada indicativa da formação de mielina (100).

Poucos estudos investigaram a expressão de *CNP* em sangue periférico, dada a provável especificidade da função da proteína. Gutiérrez-Fernández e colaboradores (2010) não observaram diferença de expressão de *CNP* em sangue periférico de indivíduos em primeiro episódio psicótico e distúrbios bipolares, em relação a indivíduos controles (131). Em nosso estudo, observamos uma maior expressão de *CNP* em sangue periférico de jovens em relação aos grupos de pacientes com DA e idosos saudáveis (Tabela 10).

Em nosso estudo, foi observada diferença estatística entre a expressão de *CNP* no cérebro de idosos e pacientes com DA, quando avaliamos o tecido sem subdividi-lo por regiões. Considerando as regiões separadamente, foi observada diferença na expressão de *CNP* entre o córtex auditivo e o córtex entorrinal, ambas localizadas no lobo temporal, de pacientes com DA e idosos saudáveis (Tabela 12).

Nossos achados corroboram o estudo de Vlkolinsky e colaboradores (2001) que demonstraram um decréscimo significativo na quantidade protéica de *CNP* na região do córtex frontal de pacientes com DA e uma tendência ao decréscimo também nas regiões de córtex parietal e temporal (101). Por outro lado, nossos resultados divergem da observação de Reinikainen e colaboradores (1989) que descreveram o aumento na quantidade de proteína *CNP* em córtex temporal de pacientes com DA (102).

Roher e colaboradores (2002) descreveram a diminuição de 17% da quantidade protéica de *CNP* na substância branca de pacientes com DA em relação à mesma região de indivíduos controles. Além disso, o estudo demonstra que a diminuição de *CNP* acompanha o grau da evolução da doença, com maior diminuição protéica ocorrendo em estágio Braak mais avançado (Braak VI) em relação ao Braak I e II (100).

É possível que, a diminuição de *CNP* encontrada no lobo temporal dos pacientes com DA do nosso estudo possa atuar na perda da função sináptica, declínio cognitivo e morte neuronal em decorrência da ausência de mielinização na região.

Na análise entre tecidos, foi observada maior expressão do gene *CNP* no sangue periférico do que no tecido cerebral, tanto no grupo de pacientes com DA como em idosos saudáveis (Tabela 16). Poucos estudos avaliaram a expressão de *CNP* em sangue periférico, e em algumas bases de dados não são encontradas referências da expressão deste gene neste tecido. A maior quantidade de RNAm de *CNP* em sangue pode se dever a participação deste gene em outras vias ainda não conhecidas ou a alterações em sua estrutura,

como polimorfismos, que possam aumentar ou diminuir a expressão gênica (132).

Peirce e colaboradores (2006) relataram a diminuição de expressão do gene *CNP* associada ao alelo A do rs2070106 (133). Além disso, Che e colaboradores (2009) descreveram diminuição, embora sem diferença estatística, da expressão de *CNP* em resposta ao tratamento farmacológico utilizando os antipsicóticos clorpromazina, risperidona e clozapina (132).

A observação da diferença de expressão entre o sangue periférico e o tecido cerebral era prevista devido a suas peculiaridades morfofuncionais. Por isso, foi avaliada a presença de correlação entre os dois tecidos para verificar se estes se comportavam da mesma forma, e se seria possível utilizar um tecido periférico como preditor da expressão deste gene no cérebro. Tal correlação não foi observada e, portanto não podemos inferir o comportamento de *CNP* no cérebro baseando-se na expressão do sangue.

Não foi observada diferença na média de metilação e em sítios CpGs específicos que possam explicar as variações encontradas no cérebro. Nas análises de sangue periférico, comparando os diferentes grupos, e comparando-se os diferentes tecidos, foi observada diferença significativa da metilação do sítio CpG7 do promotor de *CNP* (Anexo 7). Nesta região, encontra-se o sítio de ligação para o fator de transcrição *ETS1*, que atua em diversos eventos como diferenciação de células tronco e senescência celular, porém. As porcentagens de metilação foram muito baixas em todos os sítios CpGs, e provavelmente insuficientes para inibir a ligação de fatores de transcrição que possam impedir a expressão do gene.

5.3 HSPA8 e HSPA9

Proteínas *heat shock* (HSP) estão envolvidas nas mudanças conformacionais de outras proteínas por meio do dobramento e agrupamento em estruturas oligoméricas. A proteína HSPA8 atua na manutenção dos proteossomos e no reconhecimento conformacional de proteínas com dobramento errôneo, auxiliando a remoção de proteínas danificadas nos tecidos

(104). Já a HSPA9, que é induzida por privação de glicose e danos oxidativos, auxilia na sobrevivência celular sob condições de estresse (110).

Em nosso estudo, avaliamos a expressão de *HSPA8* e *HSPA9* e as duas chaperonas apresentaram o mesmo perfil de expressão nas análises entre grupos biológicos e tecidos utilizados.

No sangue periférico, foi observado aumento significativo entre a expressão de *HSPA8* e *HSPA9* no grupo de indivíduos com DA em relação aos idosos e jovens saudáveis (Tabelas 18 e 26). É possível que o aumento da expressão de *HSPA8* e *HSPA9* em pacientes com DA, esteja relacionada a uma ativação gênica na tentativa de corrigir um estresse oxidativo comumente descrito na doença (134). Torres e colaboradores (2011) relataram o aumento do nível de marcador de peroxidação lipídica, o malonaldeído, em sangue periférico de pacientes com DA e indivíduos com declínio cognitivo leve, caracterizando um aumento do estresse oxidativo nestes indivíduos (135).

Em nosso estudo, foi observada diferença estatística entre a expressão de *HSPA8* e *HSPA9* no cérebro de idosos e pacientes com DA, quando avaliamos o tecido sem subdividi-lo por regiões (Tabelas 22 e 30). Considerando as regiões separadamente, foi observada diferença na expressão de *HSPA8* e *HSPA9* entre as três regiões; córtex auditivo, córtex entorrinal e hipocampo de pacientes com DA e idosos saudáveis (Tabelas 20 e 28). Ambas chaperonas apresentaram níveis menores de expressão nos indivíduos com DA em relação aos idosos saudáveis.

Nossos resultados corroboram a diminuição proteica observada por Yoo e colaboradores em (2001), onde *HSPA8* e *HSPA9* apresentaram menores níveis de proteína no lobo temporal e *HSPA9* também apresentou diminuição em lobo parietal de pacientes com DA em relação aos idosos controles (105).

Em outras doenças neurodegenerativas a diminuição proteica de *HSPA8* e *HSPA9* também é descrita. Em modelo *in vitro* de ataxia espinocerebelar foi observada diminuição proteica de chaperonas, incluindo-se a *HSPA8*. Na Doença de Parkinson, foi descrita a diminuição significativa entre os

níveis de *HSPA8* em substância negra e diminuição de *HSPA9* em córtex pré-frontal de pacientes em relação aos controles (107, 136, 137).

É possível que a diminuição nos níveis de *HSPA8* e *HSPA9* observada em nosso estudo esteja relacionada a uma diminuição na eliminação de β A, com conseqüente agrupamento desta proteína no tecido cerebral de pacientes com DA (91). Além disso, a ausência destas chaperonas pode exercer um papel importante na morte neuronal observada na doença, uma vez que, estas atuam na sobrevivência celular expostas ao estresse oxidativo (104).

Na análise entre tecidos, foi observada maior expressão dos genes *HSPA8* e *HSPA9* no tecido cerebral em relação ao sangue periférico, tanto no grupo de pacientes com DA como em idosos saudáveis (Tabelas 24 e 32). É possível que estas chaperonas, apesar de apresentarem expressão constitutiva, tenham um papel tecido-específico. Apesar de estarem mais expressas no cérebro, as médias de expressão nos pacientes com DA foram inferiores às dos idosos controles, o que demonstra uma alteração destes genes em decorrência da doença.

Após a correção para a presença do alelo $\epsilon 4$ apenas o grupo de idosos saudáveis apresentou diferença significativa entre o sangue periférico e o cérebro (Tabela 24 e 32), possivelmente por uma diferença tecido específica na necessidade de ação das chaperonas. Apesar de não existir diferenças na expressão dos genes *HSPA8* e *HSPA9* entre sangue periférico e cérebro nos pacientes com DA, estes tecidos não se comportam da mesma maneira, e não foi possível estabelecer uma correlação entre eles. É possível que a expressão semelhante entre sangue e cérebro de pacientes com DA possa ocorrer devido á atuação tecido-específica de cada chaperona.

Para investigar se a diminuição de expressão de *HSPA8* e *HSPA9* no tecido cerebral ocorria devido a uma regulação epigenética, nosso estudo avaliou o perfil de metilação dos promotores destes genes em pacientes com DA e controles.

O promotor do gene *HSPA8* apresentou diferença nas médias de metilação entre pacientes com DA e idosos. Os sítios CpGs diferencialmente

metilados apresentavam sítios de ligação dos fatores de transcrição como *GATA1*, *GATA2* e *SP1*, sendo este último inibido por metilação. O promotor de *HSPA9* não apresentou diferença nas médias de metilação entre os grupos, mas alguns CpGs apresentaram diferença nas porcentagens de metilação. Novamente, na sequência promotora de *HSPA9* também existiam sítios de ligação dos fatores de transcrição *GATA1*, *GATA2* e *NFR-2*. Apesar das diferenças estatísticas observadas, as porcentagens de metilação foram muito baixas em todos os CpGs de *HSPA8* e *HSPA9*, e provavelmente insuficientes para inibir a ligação de fatores de transcrição que possam inibir a expressão do gene.

5.4 *LINE1*

Além da avaliação da metilação de genes candidatos, com intuito de verificar uma possível regulação epigenética específica, nosso estudo também avaliou os níveis de metilação de sequências *LINE1*.

As sequências *LINE1* são elementos de repetição que compõem 5% do genoma total da célula. Quantificar a metilação de sequências repetitivas como *LINE1*, *Alu* e α -SAT é maneira mais informativa de estimar a metilação global do genoma e esta abordagem tem sido utilizada amplamente em diversas doenças (120).

Bollati e colaboradores (2011) descreveram a metilação de sequências *LINE1*, *Alu* e *SAT- α* em sangue periférico de pacientes com DA e controles, e correlacionaram a maior metilação com o pior desempenho dos pacientes no MEEM (120). Estes achados indicam uma possível participação da metilação de *LINE1* na DA.

Em nosso estudo, foi investigada a metilação de sequências *LINE1* em pacientes com DA e idosos controles, na tentativa de avaliar se o perfil de metilação global diferia entre grupos e entre regiões cerebrais de acordo com o acometimento pela doença. Ao nosso conhecimento, este foi o primeiro estudo que avaliou o perfil de sequências *LINE1* em tecido cerebral de pacientes com DA.

Foi observada diferença estatística entre a média de metilação de *LINE1* no cérebro de idosos e pacientes com DA entre o córtex entorrinal e o hipocampo (Tabela 34). Curiosamente, as duas regiões que apresentaram diferenças entre os grupos, córtex entorrinal e hipocampo, são afetadas no início do acometimento pela DA. Porém, o padrão de metilação foi contraditório nas duas regiões, observando-se maior metilação no córtex entorrinal e menor metilação no hipocampo de pacientes em relação aos controles. O córtex auditivo, afetado mais tardiamente na doença, apresentou maior média de metilação em ambos os grupos.

É possível que a metilação de *LINE1* esteja relacionada à DA, mas não siga a ordem de acometimento clínico de cada região. Outra possibilidade é que, dado o avanço da doença nestes indivíduos, a sequência de eventos não seja mais detectável nestes pacientes.

Considerando-se a metilação de forma geral, o grupo de pacientes com DA apresentou maior metilação de sequências *LINE1* do que o grupo controle. Nossos achados corroboram o estudo de Bollati e colaboradores (2011) que apresentaram maior metilação global em pacientes com DA em relação aos controles. As médias de metilação de *LINE1* de idosos e pacientes com DA descritas em nosso estudo estão concordando com as médias de metilação descritas em sangue periféricos dos mesmos grupos (entre 80-85%).

Analisando cada região do grupo de idosos e do grupo de pacientes, o córtex auditivo apresentou maior porcentagem de metilação nos sítios CpGs em relação às demais regiões cerebrais (Tabela 34). No grupo de idosos, a segunda região mais metilada foi o hipocampo, seguido do córtex entorrinal. Já no grupo de pacientes com DA, a segunda região mais metilada foi o córtex entorrinal seguido do hipocampo.

A dinâmica de metilação de *LINE1* em cada grupo, não seguiu um padrão relacionado ao comprometimento neuropatológico inicial ou tardio de cada região na doença. Os padrões diferentes de metilação, contudo, podem estar relacionados à heterogeneidade de funções e perfis de expressão distintos de cada região.

As porcentagens de metilação de *LINE1* observadas em nosso estudo corroboram o estudo de Bollati e colaboradores (2011) que relataram cerca de 80-85%, de metilação em pacientes com DA (138).

Na análise de metilação de genes candidatos, os níveis de metilação observados em nosso estudo não ultrapassaram 1%. A correlação entre a quantidade de metilação e diminuição da expressão gênica parece ser distinta para cada gene, de acordo com a sua função ou via metabólica, porém, os dados da literatura descrevem níveis de metilação abaixo de 3-10% como hipometilados ou não metilados (139).

Como os níveis de metilação foram extremamente baixos, apesar de obtermos algumas diferenças estatísticas significantes, não consideramos tais diferenças biologicamente significantes, e acreditamos que tais níveis de metilação não sejam capazes de atuar regulando a expressão dos genes estudados.

É importante ressaltar que a metilação do DNA não é o único mecanismo epigenético capaz de regular a expressão gênica. Além disso, nosso estudo avaliou alguns sítios CpGs dos promotores gênicos, e não o promotor em sua totalidade, sendo possível que a metilação possa ocorrer em outros CpGs não avaliados.

Estudos têm demonstrado que a metilação pode ocorrer em regiões afastadas dos promotores, denominadas CpG *shores*, e desta forma, regular a expressão gênica (59). Em nosso estudo, tais regiões não foram avaliadas.

Fatores como o uso de medicamentos podem influenciar a expressão gênica e a metilação global do DNA. Muitos dos pacientes com DA avaliados em nosso estudo eram tratados com inibidores de acetilcolinesterase e neurolépticos que atuam como antagonistas do receptor de dopamina. O uso de medicamentos pode alterar globalmente a expressão gênica, afetando não somente receptores específicos. Além disso, o tratamento farmacológico pode causar modificações epigenéticas persistentes, mesmo após a interrupção do tratamento (140).

6 CONCLUSÕES

1) No sangue periférico a expressão dos genes *DPYSL2*, *CNP*, *HSPA8* e *HSPA9* diferiram entre pacientes com DA, idosos saudáveis e jovens. Os genes *DPYSL2* e *CNP* foram mais expressos nos jovens do que nos demais grupos, o que pode se dever a uma maior proliferação do sistema imunológico ou a maior atuação desses genes em vias ainda não conhecidas nos jovens. Já as chaperonas *HSPA8* e *HSPA9* foram mais expressas no sangue dos pacientes com DA do que nos demais grupos, o que pode refletir uma ativação gênica em decorrência do maior estresse oxidativo na doença;

2) De maneira geral, a expressão dos genes *DPYSL2*, *CNP*, *HSPA8* e *HSPA9* foi menor no córtex auditivo, no córtex entorrinal e no hipocampo de pacientes com DA do que em idosos controles. Indicando uma menor atividade destes genes na doença, e a participação destes na DA. É possível que a ausência dos produtos proteicos desses genes influencie na morte neuronal, na modulação de sinais extracelulares e no acúmulo de proteínas no cérebro;

3) A expressão dos genes *DPYSL2*, *CNP*, *HSPA8* e *HSPA9* não diferiu entre o córtex auditivo, o córtex entorrinal e o hipocampo dentro do grupo de pacientes com DA e dentro do grupo de idosos saudáveis. Como estes genes apresentam funções descritas como ativas no cérebro, é possível que atuem de forma semelhante nas diferentes regiões cerebrais em idosos e pacientes com DA.

4) De forma geral, a expressão dos genes *DPYSL2*, *CNP*, *HSPA8* e *HSPA9* diferiu entre o sangue periférico e o tecido cerebral tanto no grupo de pacientes com DA quanto em idosos controles, sendo *DPYSL2* e *CNP* mais expressos em sangue enquanto que, as chaperonas *HSPA8* e *HSPA9* foram mais expressas no cérebro. Essas diferenças podem ser decorrentes da especificidade e função dos genes em cada tecido.

Aparentemente, a metilação destes sítios CpGs dos promotores de *DPYSL2*, *CNP*, *HSPA8* e *HSPA9* não é o mecanismo responsável pelo controle da expressão desses genes nos diferentes tecidos e regiões cerebrais

analisados em nosso estudo. Em todas as amostras os níveis de metilação observados foram baixos, e provavelmente insuficientes para inibir a expressão.

5) A metilação de sequências *LINE1* diferiu significativamente nas três regiões cerebrais entre pacientes com DA e idosos controles e pode estar relacionada ao processo de fisiopatologia da DA.

ANEXO 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP
Escola Paulista de Medicina - EPM

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**ANÁLISE DA METILAÇÃO GLOBAL E METILAÇÃO DE GENES CANDIDATOS, E SUA INFLUÊNCIA NA EXPRESSÃO GÊNICA EM PACIENTES COM DOENÇA DE ALZHEIMER**

As seguintes informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo. A sua participação nesse estudo será muito importante para entendermos a relação dos genes *DPYSL2*, *CNP*, *HSPA8*, *HSPA9* e *LINE1* com a Doença de Alzheimer.

A Disciplina de Genética do Departamento de Morfologia e Genética, em colaboração com a Disciplina de Geriatria do Departamento de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e com a Disciplina de Genética da Faculdade de Medicina de Marília (FAMEMA), está desenvolvendo uma pesquisa para a identificação de alterações epigenéticas associadas à Doença de Alzheimer, ou seja, alterações que não envolvem a sequência de DNA. Esse estudo permitirá conhecer melhor os mecanismos desse processo e, conseqüentemente, oferecerá novas possibilidades terapêuticas.

Para essa análise, uma enfermeira treinada coletará 5 mL (cinco mililitros) de sangue por punção periférica da veia do antebraço, em tubo estéril contendo EDTA. O DNA e o RNA serão extraídos a partir dessa amostra e o DNA será submetido à técnica de bissulfito em laboratório especializado. Havendo armazenamento do material para pesquisas futuras, a utilização deste material só será realizada após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

Os desconfortos que o Sr.(a) poderá apresentar estão mais frequentemente relacionados com o local da punção, tais como dor e eritema e sintomas sistêmicos, como tontura e cefaléia. Qualquer anormalidade, que porventura venha a ocorrer, será prontamente atendida, sem ônus financeiro, pela equipe do Centro de Estudos do Envelhecimento.

O Sr.(a) não terá qualquer custo com exames e consultas realizadas. Também não haverá compensação financeira pela sua participação. Os resultados estarão a sua disposição a qualquer momento e será garantido o sigilo dessas informações.

Em qualquer etapa, o Sr.(a) poderá esclarecer dúvidas com a equipe de estudo (MSc. Patrícia Natália Oliveira da Silva – Rua Botucatu, 740 – tel.: 5576-4260) ou com o

Comitê de Ética em Pesquisa (Rua Botucatu, 572 – 1º andar – conjunto 14 – tel.: 5571-1062 ou FAX: 5539-7162). Neste projeto, a investigadora principal é Patrícia Natália Oliveira da Silva, que pode ser encontrada na Rua Botucatu, 740 – tel.: 5576-4260. Se o Sr.(a) decidir, a qualquer momento, deixar de participar do estudo, não haverá prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito do estudo descrevendo “Análise quantitativa da metilação do DNA e expressão de genes relevantes à Doença de Alzheimer”. Eu discuti com a pesquisadora Patrícia Natalia Oliveira da Silva sobre minha decisão em participar do estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário.

Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou em meu benefício nesse Serviço.

Nome do paciente

_____ Data ___/___/___

Assinatura do participante / representante legal

_____ Data ___/___/___

Assinatura da testemunha

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para participação nesse estudo.

_____ Data ___/___/___

Assinatura do responsável pelo estudo

ANEXO 2: Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (UNIFESP)

Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 6 de março de 2009.
CEP 1944/08

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) TATIANE KATSUE FURUYA
Co-Investigadores: Patrícia Natália Oliveira da Silva, Spencer Luiz Marques Payão, Marília de Arruda Cardoso Smith (orientadora)
Disciplina/Departamento: Genética Humana/Morfologia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo
Patrocinador: Recursos Próprios.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: “**Análise quantitativa da metilação do DNA e expressão de genes relevantes à doença de Alzheimer**”.

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Intervenção diagnóstica.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Sem risco, desconforto leve, envolvendo coleta de sangue.

OBJETIVOS: Avaliar o padrão e a frequência de metilação dos promotores dos genes: LR11, SNAP25 e SIRT1 no envelhecimento e na doença de Alzheimer (DA), em linfócitos e em tecido cerebral. Correlacionar o padrão de metilação dos genes LR11, SNAP25 e SIRT1 com os resultados da análise quantitativa da expressão dos 3 genes no envelhecimento e na DA, em linfócitos e tecido cerebral. Identificar marcadores genéticos no sangue e me tecido cerebral que poderão potencialmente subsidiar diagnóstico, prognóstico e terapia na DA.

RESUMO: Serão estudados 3 genes, LR11, SNAP25 e SIRT1, que foram selecionados devido à sua participação em funções como transporte e processamento de APP/amiloideogênese, transmissão sináptica e neuroproteção relevantes à DA, conforme observado em estudos de proteômica e microarray. Serão coletados 5 mL de sangue periférico de aproximadamente 50 pacientes com DA, de ambos os sexos, de 50 idosos saudáveis, 50 jovens saudáveis, além de amostras de cérebro de 10 pacientes com DA e de 10 idosos saudáveis. Serão estudados somente pacientes que apresentarem um mínimo de 3 anos de evolução da DA, os quais serão selecionados quanto à forma esporádica de acometimento tardio no Ambulatório de Neurologia do Comportamento da UNIFESP. As amostras de tecido cerebral serão oriundas do córtex e do cerebelo, respectivamente região envolvida e não envolvida na DA, obtidas por autópsia e congeladas a -80°C. Serão coletadas 10 amostras de cérebro de pacientes com DA e 10 de idosos saudáveis, a serem disponibilizadas pelo "The Brain Bank- douglas Hospital Research Centre- Montreal Quebec- Canadá". As amostras de cérebro serão descongeladas, sendo parte destinada à técnica de extração de RNA e parte à extração de DNA. Será realizada análise de metilação de DNA por PCR real time.

FUNDAMENTOS E RACIONAL: Estudos moleculares da DA permitiram a identificação de alguns genes responsáveis pela doença, entre eles o gene da substância precursora da proteína B-amilóide (APP). Estudos recentes relacionaram eventos epigenéticos à regulação de genes da DA, como os genes da APP edas alfa, beta e gama secretases, que participam do processamento de B-amilóide. Este projeto visa avaliar os padrões de metilação



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

e expressão de 3 genes relacionados ao transporte e processamento de APP/amiloidogênese, transmissão sináptica e neuroproteção..

MATERIAL E MÉTODO: Descritos os procedimentos que serão realizados.

TCLE: Apresentado adequadamente, de acordo com a res 196/96.

DETALHAMENTO FINANCEIRO: CAPES, CNPq, FAPESP.

CRONOGRAMA: 24 meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: Mestrado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: **01/03/10** e **01/03/11**.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.


1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

1944/08

ANEXO 3: Emenda Aditiva aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (UNIFESP) para a avaliação de outros genes no estudo.


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
1933

Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

CEP Nº **1944/08**
CONEP Nº:

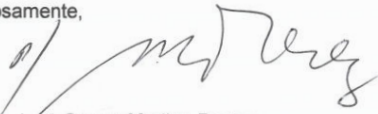
Ilmo(a) Sr(a)
Pesquisador(a): TATIANE KATSUE FURUYA
Disciplina/Departamento: Genética Humana/Morfologia

Título do estudo: Análise quantitativa da metilação do DNA e expressão de genes relevantes à doença de Alzheimer

Prezado(a) Pesquisador(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo ANALISOU E APROVOU o(a) Emenda ao projeto (versão 1 de 08/fev/2012), incorporando a análise de outros genes do projeto de pesquisa acima referenciado.

Atenciosamente,



Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

ANEXO 4: Tabela - Metilação de CpGs do gene *DPYSL2* nas três regiões cerebrais de pacientes com DA, idosos e jovens.

Córtex Auditivo	Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	p*
CpG 1 e 2	DA	9	0,03	0,02	0,03	0,00	0,06	0,88
	Idosos	8	0,04	0,03	0,03	0,01	0,10	
CpG 5	DA	9	0,01	0,01	0,00	0,00	0,02	0,85
	Idosos	8	0,01	0,01	0,01	0,00	0,02	
CpG 6	DA	10	0,01	0,01	0,01	0,00	0,03	0,46
	Idosos	8	0,01	0,01	0,01	0,00	0,01	
CpG 7	DA	10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,54
	Idosos	9	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01	
CpG 8 e 9	DA	10	0,04	0,01	0,04	0,02	0,07	0,93
	Idosos	9	0,04	0,01	0,04	0,03	0,06	
CpG 10 e 11	DA	9	0,06	0,02	0,05	0,04	0,10	0,48
	Idosos	8	0,05	0,01	0,05	0,03	0,07	
CpG 12 e 13	DA	10	0,05	0,02	0,05	0,02	0,10	0,81
	Idosos	9	0,04	0,02	0,05	0,01	0,07	
CpG 16 e 17	DA	10	0,04	0,01	0,04	0,02	0,07	0,93
	Idosos	9	0,04	0,01	0,04	0,03	0,06	

Córtex Entorrinal	Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	p*
CpG 1 e 2	DA	8	0,03	0,02	0,03	0,00	0,08	0,41
	Idosos	8	0,11	0,24	0,02	0,00	0,71	
CpG 5	DA	9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,51
	Idosos	8	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01	
CpG 6	DA	10	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01	0,36
	Idosos	8	0,01	0,01	0,01	0,00	0,03	
CpG 7	DA	10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,18
	Idosos	7	0,01	0,01	0,01	0,00	0,02	
CpG 8 e 9	DA	10	0,03	0,01	0,04	0,02	0,05	0,09
	Idosos	8	0,04	0,01	0,04	0,03	0,05	
CpG 10 e 11	DA	9	0,04	0,02	0,04	0,00	0,05	0,72
	Idosos	8	0,06	0,03	0,06	0,00	0,11	
CpG 12 e 13	DA	10	0,05	0,05	0,04	0,01	0,17	0,85
	Idosos	8	0,07	0,06	0,05	0,02	0,19	
CpG 16 e 17	DA	10	0,03	0,01	0,04	0,02	0,05	0,09
	Idosos	8	0,04	0,01	0,04	0,03	0,05	

Hipocampo	Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	p*
CpG 1 e 2	DA	11	0,11	0,23	0,03	0,00	0,78	0,56
	Idosos	7	0,05	0,08	0,02	0,00	0,22	
CpG 5	DA	9	0,01	0,01	0,01	0,00	0,02	0,46
	Idosos	9	0,00	0,01	0,00	0,00	0,02	
CpG 6	DA	11	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01	0,74
	Idosos	8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	
CpG 7	DA	11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,37
	Idosos	9	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01	
CpG 8 e 9	DA	11	0,03	0,01	0,04	0,00	0,05	0,16
	Idosos	9	0,03	0,02	0,03	0,00	0,06	
CpG 10 e 11	DA	9	0,05	0,04	0,05	0,00	0,15	0,38
	Idosos	8	0,10	0,06	0,08	0,04	0,19	
CpG 12 e 13	DA	11	0,05	0,03	0,04	0,01	0,10	0,43
	Idosos	9	0,08	0,04	0,06	0,04	0,17	
CpG 16 e 17	DA	11	0,03	0,01	0,04	0,00	0,05	0,16
	Idosos	9	0,03	0,02	0,03	0,00	0,06	

N: Número de indivíduos; p*: teste t de Student; DA: Doença de Alzheimer.

ANEXO 5: Tabela - Metilação de CpGs do gene *DPYSL2* entre as três regiões cerebrais do grupo de pacientes com DA e idosos controles.

DA	Região Cerebral	N	Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	p*
CpG 1 e 2	Córtex Auditivo	9	0,03	0,02	0,03	0,00	0,06	0,48
	Córtex Entorrinal	8	0,03	0,02	0,03	0,00	0,08	
	Hipocampo	11	0,11	0,23	0,03	0,00	0,78	
CpG 5	Córtex Auditivo	9	0,01	0,01	0,00	0,00	0,02	0,63
	Córtex Entorrinal	9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	
	Hipocampo	9	0,01	0,01	0,01	0,00	0,02	
CpG 6	Córtex Auditivo	10	0,01	0,01	0,01	0,00	0,03	0,24
	Córtex Entorrinal	10	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01	
	Hipocampo	11	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01	
CpG 7	Córtex Auditivo	10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,05
	Córtex Entorrinal	10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	
	Hipocampo	11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	
CpG 8 e 9	Córtex Auditivo	10	0,04	0,01	0,04	0,02	0,07	0,74
	Córtex Entorrinal	10	0,03	0,01	0,04	0,02	0,05	
	Hipocampo	11	0,03	0,01	0,04	0,00	0,05	
CpG 10 e 11	Córtex Auditivo	9	0,06	0,02	0,05	0,04	0,10	0,55
	Córtex Entorrinal	9	0,04	0,02	0,04	0,00	0,05	
	Hipocampo	9	0,05	0,04	0,05	0,00	0,15	
CpG 12 e 13	Córtex Auditivo	10	0,05	0,02	0,05	0,02	0,10	0,89
	Córtex Entorrinal	10	0,05	0,05	0,04	0,01	0,17	
	Hipocampo	11	0,05	0,03	0,04	0,01	0,10	
CpG 16 e 17	Córtex Auditivo	10	0,04	0,01	0,04	0,02	0,07	0,74
	Córtex Entorrinal	10	0,03	0,01	0,04	0,02	0,05	
	Hipocampo	11	0,03	0,01	0,04	0,00	0,05	
Idosos	Região Cerebral	N	Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	p*
CpG 1 e 2	Córtex Auditivo	8	0,04	0,03	0,03	0,01	0,10	0,89
	Córtex Entorrinal	8	0,11	0,24	0,02	0,00	0,71	
	Hipocampo	7	0,05	0,08	0,02	0,00	0,22	
CpG 5	Córtex Auditivo	8	0,01	0,01	0,01	0,00	0,02	0,50
	Córtex Entorrinal	8	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01	
	Hipocampo	9	0,00	0,01	0,00	0,00	0,02	
CpG 6	Córtex Auditivo	8	0,01	0,01	0,01	0,00	0,01	0,37
	Córtex Entorrinal	8	0,01	0,01	0,01	0,00	0,03	
	Hipocampo	8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	
CpG 7	Córtex Auditivo	9	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01	1,00
	Córtex Entorrinal	7	0,01	0,01	0,01	0,00	0,02	
	Hipocampo	9	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01	
CpG 8 e 9	Córtex Auditivo	9	0,04	0,01	0,04	0,03	0,06	0,77
	Córtex Entorrinal	8	0,04	0,01	0,04	0,03	0,05	
	Hipocampo	9	0,03	0,02	0,03	0,00	0,06	
CpG 10 e 11	Córtex Auditivo	8	0,05	0,01	0,05	0,03	0,07	0,72
	Córtex Entorrinal	8	0,06	0,03	0,06	0,00	0,11	
	Hipocampo	8	0,10	0,06	0,08	0,04	0,19	
CpG 12 e 13	Córtex Auditivo	9	0,04	0,02	0,05	0,01	0,07	0,47
	Córtex Entorrinal	8	0,07	0,06	0,05	0,02	0,19	
	Hipocampo	9	0,08	0,04	0,06	0,04	0,17	
CpG 16 e 17	Córtex Auditivo	9	0,04	0,01	0,04	0,03	0,06	0,77
	Córtex Entorrinal	8	0,04	0,01	0,04	0,03	0,05	
	Hipocampo	9	0,03	0,02	0,03	0,00	0,06	

N: Número de indivíduos; p*: teste ANOVA; DA: Doença de Alzheimer.

ANEXO 6: Tabela - Metilação de CpGs do gene *DPYSL2* no cérebro de pacientes com DA e idosos.

Cérebro	Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	p*
CpG 1 e 2	DA	28	0,06	0,14	0,03	0,00	0,78	0,57
	Idosos	23	0,15	0,07	0,02	0,00	0,71	
CpG 5	DA	27	0,01	0,01	0,00	0,00	0,02	0,33
	Idosos	25	0,01	0,01	0,01	0,00	0,02	
CpG 6	DA	31	0,01	0,01	0,00	0,00	0,03	0,68
	Idosos	24	0,01	0,01	0,01	0,00	0,03	
CpG 7	DA	31	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,73
	Idosos	25	0,01	0,01	0,01	0,00	0,02	
CpG 8 e 9	DA	31	0,04	0,01	0,04	0,00	0,07	0,09
	Idosos	26	0,01	0,04	0,04	0,00	0,06	
CpG 10 e 11	DA	27	0,05	0,03	0,04	0,00	0,15	0,54
	Idosos	24	0,04	0,07	0,06	0,00	0,19	
CpG 12 e 13	DA	31	0,05	0,03	0,04	0,01	0,17	0,44
	Idosos	26	0,04	0,06	0,06	0,01	0,19	
CpG 16 e 17	DA	31	0,04	0,01	0,04	0,00	0,07	0,09
	Idosos	26	0,01	0,04	0,04	0,00	0,06	

N: Número de indivíduos; p*: teste t de Student; DA: Doença de Alzheimer.

ANEXO 7: Metilação de CpGs do gene *CNP* no sangue periférico de pacientes com DA, idosos e jovens.

Sangue	Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	p*	Post hoc
CpG 1	DA	27	0,01	0,01	0,01	0,00	0,05	0,08	
	Idosos	17	0,03	0,03	0,02	0,00	0,08		
	Jovem	19	0,02	0,02	0,01	0,00	0,05		
CpG 2 e 3	DA	30	0,03	0,02	0,03	0,01	0,14	0,34	
	Idosos	20	0,04	0,04	0,03	0,00	0,18		
	Jovem	19	0,02	0,02	0,02	0,00	0,08		
CpG 4	DA	29	0,03	0,01	0,04	0,00	0,06	0,88	
	Idosos	20	0,03	0,02	0,04	0,00	0,08		
	Jovem	19	0,03	0,01	0,04	0,00	0,06		
CpG 5 e 6	DA	29	0,03	0,01	0,03	0,01	0,06	0,67	
	Idosos	20	0,03	0,02	0,03	0,01	0,06		
	Jovem	19	0,03	0,02	0,03	0,00	0,06		
CpG 7	DA	28	0,05	0,02	0,05	0,02	0,09	0,001	DA x Idoso p=0,003 DA x Jovem p=0,01
	Idosos	19	0,03	0,02	0,03	0,00	0,06		
	Jovem	18	0,03	0,02	0,04	0,00	0,06		
CpG 8	DA	29	0,05	0,03	0,04	0,03	0,14	0,32	
	Idosos	21	0,06	0,04	0,04	0,03	0,15		
	Jovem	19	0,04	0,03	0,03	0,02	0,13		
CpG 10	DA	29	0,02	0,01	0,02	0,00	0,03	0,02	DA x Jovem p=0,06
	Idosos	19	0,03	0,02	0,02	0,00	0,07		
	Jovem	19	0,03	0,02	0,03	0,00	0,06		
CpG 11 e 12	DA	28	0,04	0,02	0,04	0,01	0,09	0,12	
	Idosos	21	0,04	0,02	0,04	0,02	0,09		
	Jovem	19	0,03	0,01	0,03	0,01	0,06		
CpG 13 e 14	DA	30	0,05	0,01	0,05	0,00	0,07	0,03	DA x Idoso p=0,07
	Idosos	19	0,04	0,02	0,04	0,01	0,06		
	Jovem	19	0,04	0,02	0,04	0,01	0,06		
CpG 15	DA	30	0,01	0,01	0,01	0,00	0,03	0,32	
	Idosos	20	0,01	0,01	0,01	0,00	0,02		
	Jovem	19	0,01	0,01	0,01	0,00	0,02		

N: Número de indivíduos; p*: teste t de Student; DA: Doença de Alzheimer.

ANEXO 8: Tabela - Metilação de CpGs do gene *CNP* entre as três regiões cerebrais do grupo de pacientes com DA e idosos controles.

Córtex Auditivo		N	Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	p*
CpG 1	DA	12	0,01	0,02	0,01	0,00	0,04	0,59
	Idosos	9	0,01	0,01	0,01	0,00	0,03	
CpG 2 e 3	DA	12	0,02	0,01	0,03	0,01	0,05	0,61
	Idosos	8	0,02	0,01	0,02	0,01	0,04	
CpG 4	DA	12	0,04	0,01	0,04	0,01	0,06	0,83
	Idosos	10	0,04	0,02	0,05	0,00	0,05	
CpG 5 e 6	DA	12	0,03	0,01	0,03	0,01	0,06	0,76
	Idosos	10	0,03	0,01	0,03	0,01	0,04	
CpG 7	DA	12	0,07	0,02	0,08	0,03	0,12	0,18
	Idosos	10	0,06	0,02	0,07	0,03	0,08	
CpG 8	DA	12	0,06	0,04	0,05	0,03	0,17	0,18
	Idosos	8	0,04	0,01	0,04	0,03	0,05	
CpG 10	DA	12	0,02	0,01	0,02	0,00	0,05	0,96
	Idosos	9	0,02	0,01	0,02	0,00	0,04	
CpG 11 e 12	DA	12	0,04	0,02	0,04	0,02	0,08	0,61
	Idosos	10	0,05	0,02	0,04	0,02	0,08	
CpG 13 e 14	DA	12	0,05	0,02	0,05	0,00	0,07	0,47
	Idosos	9	0,05	0,01	0,05	0,04	0,06	
CpG 15	DA	12	0,01	0,01	0,02	0,00	0,02	0,58
	Idosos	10	0,02	0,01	0,02	0,01	0,03	

Córtex Entorrinal		N	Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	p
CpG 1	DA	11	0,01	0,01	0,01	0,00	0,05	0,62
	Idosos	8	0,02	0,01	0,01	0,01	0,03	
CpG 2 e 3	DA	11	0,03	0,02	0,03	0,01	0,07	0,52
	Idosos	9	0,02	0,01	0,03	0,01	0,05	
CpG 4	DA	12	0,04	0,02	0,04	0,00	0,08	0,61
	Idosos	10	0,03	0,02	0,03	0,00	0,06	
CpG 5 e 6	DA	11	0,03	0,02	0,03	0,01	0,06	0,36
	Idosos	10	0,03	0,01	0,03	0,01	0,04	
CpG 7	DA	11	0,05	0,03	0,05	0,00	0,10	0,77
	Idosos	10	0,06	0,02	0,07	0,00	0,08	
CpG 8	DA	10	0,05	0,02	0,05	0,03	0,09	0,29
	Idosos	9	0,07	0,03	0,05	0,03	0,11	
CpG 10	DA	12	0,01	0,01	0,01	0,00	0,04	0,46
	Idosos	10	0,02	0,01	0,02	0,00	0,04	
CpG 11 e 12	DA	11	0,05	0,02	0,05	0,02	0,08	0,58
	Idosos	10	0,04	0,02	0,04	0,02	0,07	
CpG 13 e 14	DA	12	0,04	0,02	0,05	0,00	0,07	0,94
	Idosos	10	0,04	0,02	0,05	0,01	0,07	
CpG 15	DA	10	0,02	0,01	0,02	0,00	0,03	0,34
	Idosos	10	0,01	0,00	0,01	0,01	0,02	

continua

continuação

Hipocampo		N	Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	p*
CpG 1	DA	12	0,02	0,02	0,01	0,00	0,06	0,60
	Idosos	9	0,01	0,02	0,01	0,00	0,05	
CpG 2 e 3	DA	12	0,02	0,01	0,03	0,01	0,04	0,21
	Idosos	10	0,02	0,01	0,02	0,01	0,03	
CpG 4	DA	12	0,04	0,01	0,04	0,00	0,05	0,51
	Idosos	10	0,04	0,01	0,04	0,03	0,06	
CpG 5 e 6	DA	12	0,03	0,01	0,03	0,01	0,05	0,07
	Idosos	10	0,02	0,01	0,02	0,01	0,04	
CpG 7	DA	12	0,06	0,02	0,06	0,04	0,09	0,92
	Idosos	10	0,06	0,02	0,06	0,03	0,08	
CpG 8	DA	12	0,05	0,02	0,05	0,03	0,10	0,77
	Idosos	10	0,06	0,02	0,06	0,03	0,11	
CpG 10	DA	12	0,01	0,01	0,01	0,00	0,04	0,84
	Idosos	10	0,01	0,01	0,01	0,00	0,04	
CpG 11 e 12	DA	12	0,04	0,02	0,04	0,02	0,08	0,94
	Idosos	9	0,04	0,01	0,03	0,03	0,06	
CpG 13 e 14	DA	12	0,05	0,01	0,05	0,04	0,06	0,66
	Idosos	10	0,05	0,02	0,05	0,03	0,09	
CpG 15	DA	12	0,02	0,01	0,02	0,01	0,03	0,01
	Idosos	10	0,01	0,01	0,01	0,00	0,02	

N: Número de indivíduos; p*: teste t de Student; DA: Doença de Alzheimer.

ANEXO 9: Tabela - Metilação de CpGs do gene *CNP* entre as três regiões cerebrais do grupo de pacientes com DA e idosos controles.

DA	Região Cerebral	N	Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	p*
CpG 1	Córtex Auditivo	12	0,01	0,02	0,01	0,00	0,04	0,92
	Córtex Entorrinal	11	0,01	0,01	0,01	0,00	0,05	
	Hipocampo	12	0,02	0,02	0,01	0,00	0,06	
CpG 2 e 3	Córtex Auditivo	12	0,02	0,01	0,03	0,01	0,05	0,76
	Córtex Entorrinal	11	0,03	0,02	0,03	0,01	0,07	
	Hipocampo	12	0,02	0,01	0,03	0,01	0,04	
CpG 4	Córtex Auditivo	12	0,04	0,01	0,04	0,01	0,06	0,89
	Córtex Entorrinal	12	0,04	0,02	0,04	0,00	0,08	
	Hipocampo	12	0,04	0,01	0,04	0,00	0,05	
CpG 5 e 6	Córtex Auditivo	12	0,03	0,01	0,03	0,01	0,06	0,96
	Córtex Entorrinal	11	0,03	0,02	0,03	0,01	0,06	
	Hipocampo	12	0,03	0,01	0,03	0,01	0,05	
CpG 7	Córtex Auditivo	12	0,07	0,02	0,08	0,03	0,12	0,14
	Córtex Entorrinal	11	0,05	0,03	0,05	0,00	0,10	
	Hipocampo	12	0,06	0,02	0,06	0,04	0,09	
CpG 8	Córtex Auditivo	12	0,06	0,04	0,05	0,03	0,17	0,86
	Córtex Entorrinal	10	0,05	0,02	0,05	0,03	0,09	
	Hipocampo	12	0,05	0,02	0,05	0,03	0,10	
CpG 10	Córtex Auditivo	12	0,02	0,01	0,02	0,00	0,05	0,66
	Córtex Entorrinal	12	0,01	0,01	0,01	0,00	0,04	
	Hipocampo	12	0,01	0,01	0,01	0,00	0,04	
CpG 11 e 12	Córtex Auditivo	12	0,04	0,02	0,04	0,02	0,08	0,55
	Córtex Entorrinal	11	0,05	0,02	0,05	0,02	0,08	
	Hipocampo	12	0,04	0,02	0,04	0,02	0,08	
CpG 13 e 14	Córtex Auditivo	12	0,05	0,02	0,05	0,00	0,07	0,87
	Córtex Entorrinal	12	0,04	0,02	0,05	0,00	0,07	
	Hipocampo	12	0,05	0,01	0,05	0,04	0,06	
CpG 15	Córtex Auditivo	12	0,01	0,01	0,02	0,00	0,02	0,36
	Córtex Entorrinal	10	0,02	0,01	0,02	0,00	0,03	
	Hipocampo	12	0,02	0,01	0,02	0,01	0,03	

continua

continuação

Idosos	Região Cerebral	N	Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	p*
CpG 1	Córtex Auditivo	9	0,01	0,01	0,01	0,00	0,03	0,55
	Córtex Entorrinal	8	0,02	0,01	0,01	0,01	0,03	
	Hipocampo	9	0,01	0,02	0,01	0,00	0,05	
CpG 2 e 3	Córtex Auditivo	8	0,02	0,01	0,02	0,01	0,04	0,61
	Córtex Entorrinal	9	0,02	0,01	0,03	0,01	0,05	
	Hipocampo	10	0,02	0,01	0,02	0,01	0,03	
CpG 4	Córtex Auditivo	10	0,04	0,02	0,05	0,00	0,05	0,33
	Córtex Entorrinal	10	0,03	0,02	0,03	0,00	0,06	
	Hipocampo	10	0,04	0,01	0,04	0,03	0,06	
CpG 5 e 6	Córtex Auditivo	10	0,03	0,01	0,03	0,01	0,04	0,21
	Córtex Entorrinal	10	0,03	0,01	0,03	0,01	0,04	
	Hipocampo	10	0,02	0,01	0,02	0,01	0,04	
CpG 7	Córtex Auditivo	10	0,06	0,02	0,07	0,03	0,08	0,93
	Córtex Entorrinal	10	0,06	0,02	0,07	0,00	0,08	
	Hipocampo	10	0,06	0,02	0,06	0,03	0,08	
CpG 8	Córtex Auditivo	8	0,04	0,01	0,04	0,03	0,05	0,09
	Córtex Entorrinal	9	0,07	0,03	0,05	0,03	0,11	
	Hipocampo	10	0,06	0,02	0,06	0,03	0,11	
CpG 10	Córtex Auditivo	9	0,02	0,01	0,02	0,00	0,04	0,72
	Córtex Entorrinal	10	0,02	0,01	0,02	0,00	0,04	
	Hipocampo	10	0,01	0,01	0,01	0,00	0,04	
CpG 11 e 12	Córtex Auditivo	10	0,05	0,02	0,04	0,02	0,08	0,74
	Córtex Entorrinal	10	0,04	0,02	0,04	0,02	0,07	
	Hipocampo	9	0,04	0,01	0,03	0,03	0,06	
CpG 13 e 14	Córtex Auditivo	9	0,05	0,01	0,05	0,04	0,06	0,54
	Córtex Entorrinal	10	0,04	0,02	0,05	0,01	0,07	
	Hipocampo	10	0,05	0,02	0,05	0,03	0,09	
CpG 15	Córtex Auditivo	10	0,02	0,01	0,02	0,01	0,03	0,14
	Córtex Entorrinal	10	0,01	0,00	0,01	0,01	0,02	
	Hipocampo	10	0,01	0,01	0,01	0,00	0,02	

N: Número de indivíduos; p*: teste ANOVA; DA: Doença de Alzheimer.

ANEXO 10: Metilação de CpGs do gene *CNP* no cérebro de pacientes com DA e idosos.

Cérebro	Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	p*
CpG 1	DA	35	0,02	0,02	0,01	0,00	0,06	0,66
	Idosos	26	0,01	0,01	0,01	0,00	0,05	
CpG 2 e 3	DA	35	0,03	0,01	0,03	0,01	0,07	0,17
	Idosos	27	0,02	0,01	0,02	0,01	0,05	
CpG 4	DA	36	0,04	0,02	0,04	0,00	0,08	0,83
	Idosos	30	0,04	0,02	0,04	0,00	0,06	
CpG 5 e 6	DA	35	0,03	0,01	0,03	0,01	0,06	0,08
	Idosos	30	0,03	0,01	0,03	0,01	0,04	
CpG 7	DA	35	0,06	0,02	0,06	0,00	0,12	0,50
	Idosos	30	0,06	0,02	0,06	0,00	0,08	
CpG 8	DA	34	0,06	0,03	0,05	0,03	0,17	0,98
	Idosos	27	0,05	0,02	0,04	0,03	0,11	
CpG 10	DA	36	0,01	0,01	0,01	0,00	0,05	0,74
	Idosos	29	0,02	0,01	0,01	0,00	0,04	
CpG 11 e 12	DA	35	0,04	0,02	0,04	0,02	0,08	0,93
	Idosos	29	0,04	0,02	0,04	0,02	0,08	
CpG 13 e 14	DA	36	0,05	0,02	0,05	0,00	0,07	0,55
	Idosos	29	0,05	0,01	0,05	0,01	0,09	
CpG 15	DA	34	0,02	0,01	0,02	0,00	0,03	0,09
	Idosos	30	0,01	0,01	0,01	0,00	0,03	

N: Número de indivíduos; p*: teste t de Student; DA: Doença de Alzheimer.

ANEXO 11: Metilação de CpGs do gene *CNP* entre sangue periférico e cérebro de pacientes com DA e idosos.

DA		N	Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	p*
CpG 1	Cérebro	35	0,02	0,02	0,01	0,00	0,06	0,93
	Sangue	27	0,01	0,01	0,01	0,00	0,05	
CpG 2 e 3	Cérebro	35	0,03	0,01	0,03	0,01	0,07	0,42
	Sangue	30	0,03	0,02	0,03	0,01	0,14	
CpG 4	Cérebro	36	0,04	0,02	0,04	0,00	0,08	0,43
	Sangue	29	0,03	0,01	0,04	0,00	0,06	
CpG 5 e 6	Cérebro	35	0,03	0,01	0,03	0,01	0,06	0,81
	Sangue	29	0,03	0,01	0,03	0,01	0,06	
CpG 7	Cérebro	35	0,06	0,02	0,06	0,00	0,12	0,03
	Sangue	28	0,05	0,02	0,05	0,02	0,09	
CpG 8	Cérebro	34	0,06	0,03	0,05	0,03	0,17	0,78
	Sangue	29	0,05	0,03	0,04	0,03	0,14	
CpG 10	Cérebro	36	0,01	0,01	0,01	0,00	0,05	0,63
	Sangue	29	0,02	0,01	0,02	0,00	0,03	
CpG 11 e 12	Cérebro	35	0,04	0,02	0,04	0,02	0,08	0,25
	Sangue	28	0,04	0,02	0,04	0,01	0,09	
CpG 13 e 14	Cérebro	36	0,05	0,02	0,05	0,00	0,07	0,71
	Sangue	30	0,05	0,01	0,05	0,00	0,07	
CpG 15	Cérebro	34	0,02	0,01	0,02	0,00	0,03	0,11
	Sangue	30	0,01	0,01	0,01	0,00	0,03	

Idosos		N	Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	p*
CpG 1	Cérebro	26	0,01	0,01	0,01	0,00	0,05	0,08
	Sangue	17	0,03	0,03	0,02	0,00	0,08	
CpG 2 e 3	Cérebro	27	0,02	0,01	0,02	0,01	0,05	0,05
	Sangue	20	0,04	0,04	0,03	0,00	0,18	
CpG 4	Cérebro	30	0,04	0,02	0,04	0,00	0,06	0,41
	Sangue	20	0,03	0,02	0,04	0,00	0,08	
CpG 5 e 6	Cérebro	30	0,03	0,01	0,03	0,01	0,04	0,05
	Sangue	20	0,03	0,02	0,03	0,01	0,06	
CpG 7	Cérebro	30	0,06	0,02	0,06	0,00	0,08	<0,001
	Sangue	19	0,03	0,02	0,03	0,00	0,06	
CpG 8	Cérebro	27	0,05	0,02	0,04	0,03	0,11	0,83
	Sangue	21	0,06	0,04	0,04	0,03	0,15	
CpG 10	Cérebro	29	0,02	0,01	0,01	0,00	0,04	0,05
	Sangue	19	0,03	0,02	0,02	0,00	0,07	
CpG 11 e 12	Cérebro	29	0,04	0,02	0,04	0,02	0,08	0,73
	Sangue	21	0,04	0,02	0,04	0,02	0,09	
CpG 13 e 14	Cérebro	29	0,05	0,01	0,05	0,01	0,09	0,01
	Sangue	19	0,04	0,02	0,04	0,01	0,06	
CpG 15	Cérebro	30	0,01	0,01	0,01	0,00	0,03	0,61
	Sangue	20	0,01	0,01	0,01	0,00	0,02	

N: Número de indivíduos; p*: teste t de Student; DA: Doença de Alzheimer.

ANEXO 12: Metilação de CpGs do gene *HSPA8* no sangue periférico de pacientes com DA, idosos e jovens.

Sangue	Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	p*	Post hoc
CpG 1	DA	22	0,02	0,01	0,02	0,00	0,05	0,01	
	Idosos	13	0,00	0,01	0,00	0,00	0,02		
	Jovem	—	—	—	—	—	—		
CpG 2, 3 e 4	DA	24	0,03	0,02	0,03	0,00	0,08	0,02	DA x Jovem p=0,02
	Idosos	11	0,02	0,03	0,01	0,00	0,09		
	Jovem	15	0,01	0,01	0,01	0,00	0,03		
CpG 6	DA	23	0,01	0,01	0,01	0,00	0,04	0,07	DA x Jovem p=0,06
	Idosos	14	0,02	0,01	0,01	0,00	0,04		
	Jovem	14	0,02	0,01	0,02	0,00	0,04		
CpG 7, 8, 9, 10 e 11	DA	23	0,09	0,04	0,08	0,03	0,18	0,001	DA x Idoso p=0,01 DA x jovem p=0,01
	Idosos	10	0,16	0,11	0,17	0,01	0,30		
	Jovem	12	0,15	0,05	0,16	0,07	0,23		
CpG 12	DA	24	0,01	0,01	0,01	0,00	0,02	0,003	DA x Jovem p=0,002
	Idosos	12	0,01	0,01	0,00	0,00	0,04		
	Jovem	15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
CpG 13 e 14	DA	22	0,05	0,02	0,05	0,01	0,08	<0,001	DA x Idoso p=0,03 DA x jovem p=<0,001
	Idosos	7	0,03	0,02	0,01	0,01	0,07		
	Jovem	13	0,01	0,01	0,01	0,00	0,03		
CpG 15	DA	24	0,05	0,05	0,03	0,00	0,29	0,004	DA x Idoso p=0,02 DA x jovem p=0,02
	Idosos	12	0,12	0,10	0,08	0,00	0,26		
	Jovem	15	0,11	0,06	0,10	0,02	0,24		
CpG 18	DA	22	0,02	0,03	0,01	0,00	0,12	0,04	DA x Idoso p=0,04
	Idosos	13	0,06	0,05	0,07	0,00	0,17		
	Jovem	15	0,04	0,05	0,03	0,00	0,18		
CpG 19 e 20	DA	24	0,08	0,06	0,06	0,00	0,33	0,80	
	Idosos	9	0,08	0,12	0,02	0,00	0,30		
	Jovem	12	0,10	0,11	0,04	0,00	0,35		
CpG 22	DA	23	0,02	0,01	0,01	0,00	0,05	0,003	DA x Jovem p=0,002
	Idosos	10	0,01	0,01	0,00	0,00	0,04		
	Jovem	15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01		

N: Número de indivíduos; p*: teste ANOVA; DA: Doença de Alzheimer.

ANEXO 13: Tabela - Metilação de CpGs do gene *HSPA8* nas três regiões cerebrais do grupo de pacientes com DA e idosos controles.

Córtex Auditivo		N	Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	p*
CpG 1	DA	12	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,34
	Idosos	10	0,02	0,01	0,02	0,01	0,03	
CpG 2, 3 e 4	DA	12	0,04	0,04	0,02	0,01	0,11	0,94
	Idosos	10	0,04	0,02	0,04	0,01	0,08	
CpG 6	DA	12	0,02	0,01	0,02	0,00	0,03	0,53
	Idosos	10	0,01	0,01	0,02	0,00	0,03	
CpG 7, 8, 9, 10 e 11	DA	12	0,09	0,04	0,09	0,04	0,16	0,57
	Idosos	10	0,08	0,02	0,08	0,05	0,11	
CpG 12	DA	12	0,01	0,01	0,01	0,00	0,02	1,00
	Idosos	10	0,01	0,01	0,01	0,00	0,02	
CpG 13 e 14	DA	12	0,05	0,01	0,05	0,03	0,07	0,50
	Idosos	10	0,05	0,02	0,05	0,02	0,08	
CpG 15	DA	12	0,03	0,01	0,03	0,02	0,06	0,34
	Idosos	10	0,03	0,01	0,03	0,01	0,04	
CpG 18	DA	12	0,02	0,03	0,01	0,00	0,09	0,83
	Idosos	10	0,02	0,02	0,02	0,00	0,07	
CpG 19 e 20	DA	12	0,05	0,02	0,06	0,01	0,08	0,32
	Idosos	10	0,06	0,01	0,06	0,04	0,08	
CpG 22	DA	11	0,01	0,01	0,01	0,00	0,03	0,72
	Idosos	10	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	

continua

continuação

Córtex Entorrinal		N	Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	p*
CpG 1	DA	12	0,01	0,01	0,01	0,00	0,03	0,13
	Idosos	10	0,02	0,00	0,02	0,01	0,02	
CpG 2, 3 e 4	DA	12	0,04	0,04	0,04	0,00	0,14	0,68
	Idosos	10	0,05	0,04	0,04	0,01	0,12	
CpG 6	DA	11	0,01	0,01	0,00	0,00	0,02	0,28
	Idosos	10	0,01	0,01	0,01	0,00	0,03	
CpG 7, 8, 9, 10 e 11	DA	10	0,09	0,05	0,08	0,04	0,20	0,88
	Idosos	10	0,08	0,04	0,08	0,04	0,18	
CpG 12	DA	12	0,01	0,01	0,01	0,00	0,02	0,58
	Idosos	10	0,01	0,01	0,01	0,00	0,02	
CpG 13 e 14	DA	12	0,04	0,03	0,05	0,00	0,09	0,10
	Idosos	9	0,06	0,02	0,07	0,02	0,09	
CpG 15	DA	12	0,08	0,09	0,05	0,00	0,32	0,12
	Idosos	10	0,03	0,02	0,03	0,00	0,08	
CpG 18	DA	11	0,04	0,02	0,04	0,01	0,07	0,17
	Idosos	10	0,03	0,03	0,02	0,00	0,10	
CpG 19 e 20	DA	11	0,05	0,02	0,06	0,00	0,07	0,66
	Idosos	10	0,05	0,02	0,06	0,00	0,08	
CpG 22	DA	10	0,02	0,01	0,02	0,01	0,03	0,58
	Idosos	9	0,01	0,01	0,01	0,00	0,04	
Hipocampo		N	Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	p*
CpG 1	DA	12	0,02	0,01	0,02	0,01	0,04	0,27
	Idosos	10	0,02	0,01	0,02	0,01	0,03	
CpG 2, 3 e 4	DA	12	0,05	0,02	0,05	0,01	0,09	0,48
	Idosos	10	0,04	0,03	0,02	0,01	0,09	
CpG 6	DA	12	0,02	0,01	0,02	0,00	0,03	0,22
	Idosos	10	0,01	0,01	0,01	0,00	0,03	
CpG 7, 8, 9, 10 e 11	DA	12	0,10	0,04	0,09	0,06	0,17	0,13
	Idosos	10	0,08	0,03	0,08	0,03	0,13	
CpG 12	DA	12	0,01	0,00	0,01	0,01	0,02	0,44
	Idosos	10	0,01	0,01	0,01	0,00	0,02	
CpG 13 e 14	DA	12	0,06	0,02	0,06	0,03	0,08	0,16
	Idosos	10	0,05	0,01	0,05	0,02	0,06	
CpG 15	DA	12	0,03	0,01	0,03	0,01	0,05	0,81
	Idosos	10	0,03	0,01	0,03	0,00	0,04	
CpG 18	DA	12	0,01	0,01	0,01	0,00	0,04	0,74
	Idosos	10	0,02	0,02	0,01	0,00	0,07	
CpG 19 e 20	DA	12	0,05	0,01	0,05	0,03	0,08	0,11
	Idosos	10	0,07	0,03	0,06	0,05	0,11	
CpG 22	DA	12	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,15
	Idosos	10	0,02	0,01	0,02	0,01	0,04	

N: Número de indivíduos; p*: teste t de Student; DA: Doença de Alzheimer.

ANEXO 14: Metilação de CpGs do gene HSPA8 entre as três regiões cerebrais de pacientes com DA e idosos.

DA	Região Cerebral	N	Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	p*	Post hoc
CpG 1	Córtex Auditivo	12	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	H x CE p=0,02
	Córtex Entorrinal	12	0,01	0,01	0,01	0,00	0,03		
	Hipocampo	12	0,02	0,01	0,02	0,01	0,04		
CpG 2, 3 e 4	Córtex Auditivo	12	0,04	0,04	0,02	0,01	0,11	0,89	
	Córtex Entorrinal	12	0,04	0,04	0,04	0,00	0,14		
	Hipocampo	12	0,05	0,02	0,05	0,01	0,09		
CpG 6	Córtex Auditivo	12	0,02	0,01	0,02	0,00	0,03	0,003	CA x CE p=0,008 CE x H p=0,008
	Córtex Entorrinal	11	0,01	0,01	0,00	0,00	0,02		
	Hipocampo	12	0,02	0,01	0,02	0,00	0,03		
CpG 7, 8, 9, 10 e 11	Córtex Auditivo	12	0,09	0,04	0,09	0,04	0,16	0,81	
	Córtex Entorrinal	10	0,09	0,05	0,08	0,04	0,20		
	Hipocampo	12	0,10	0,04	0,09	0,06	0,17		
CpG 12	Córtex Auditivo	12	0,01	0,01	0,01	0,00	0,02	0,55	
	Córtex Entorrinal	12	0,01	0,01	0,01	0,00	0,02		
	Hipocampo	12	0,01	0,00	0,01	0,01	0,02		
CpG 13 e 14	Córtex Auditivo	12	0,05	0,01	0,05	0,03	0,07	0,21	
	Córtex Entorrinal	12	0,04	0,03	0,05	0,00	0,09		
	Hipocampo	12	0,06	0,02	0,06	0,03	0,08		
CpG 15	Córtex Auditivo	12	0,03	0,01	0,03	0,02	0,06	0,04	CE x H p=0,07
	Córtex Entorrinal	12	0,08	0,09	0,05	0,00	0,32		
	Hipocampo	12	0,03	0,01	0,03	0,01	0,05		
CpG 18	Córtex Auditivo	12	0,02	0,03	0,01	0,00	0,09	0,01	CA x CE p=0,034 CE x H p=0,011
	Córtex Entorrinal	11	0,04	0,02	0,04	0,01	0,07		
	Hipocampo	12	0,01	0,01	0,01	0,00	0,04		
CpG 19 e 20	Córtex Auditivo	12	0,05	0,02	0,06	0,01	0,08	0,53	
	Córtex Entorrinal	11	0,05	0,02	0,06	0,00	0,07		
	Hipocampo	12	0,05	0,01	0,05	0,03	0,08		
CpG 22	Córtex Auditivo	11	0,01	0,01	0,01	0,00	0,03	0,43	
	Córtex Entorrinal	10	0,02	0,01	0,02	0,01	0,03		
	Hipocampo	12	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02		

continua

continuação

Idosos	Região Cerebral	N	Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	p*
CpG 1	Córtex Auditivo	10	0,02	0,01	0,02	0,01	0,03	0,93
	Córtex Entorrinal	10	0,02	0,00	0,02	0,01	0,02	
	Hipocampo	10	0,02	0,01	0,02	0,01	0,03	
CpG 2, 3 e 4	Córtex Auditivo	10	0,04	0,02	0,04	0,01	0,08	0,77
	Córtex Entorrinal	10	0,05	0,04	0,04	0,01	0,12	
	Hipocampo	10	0,04	0,03	0,02	0,01	0,09	
CpG 6	Córtex Auditivo	10	0,01	0,01	0,02	0,00	0,03	0,72
	Córtex Entorrinal	10	0,01	0,01	0,01	0,00	0,03	
	Hipocampo	10	0,01	0,01	0,01	0,00	0,03	
CpG 7, 8, 9, 10 e 11	Córtex Auditivo	10	0,08	0,02	0,08	0,05	0,11	0,75
	Córtex Entorrinal	10	0,08	0,04	0,08	0,04	0,18	
	Hipocampo	10	0,08	0,03	0,08	0,03	0,13	
CpG 12	Córtex Auditivo	10	0,01	0,01	0,01	0,00	0,02	0,93
	Córtex Entorrinal	10	0,01	0,01	0,01	0,00	0,02	
	Hipocampo	10	0,01	0,01	0,01	0,00	0,02	
CpG 13 e 14	Córtex Auditivo	10	0,05	0,02	0,05	0,02	0,08	0,25
	Córtex Entorrinal	9	0,06	0,02	0,07	0,02	0,09	
	Hipocampo	10	0,05	0,01	0,05	0,02	0,06	
CpG 15	Córtex Auditivo	10	0,03	0,01	0,03	0,01	0,04	0,76
	Córtex Entorrinal	10	0,03	0,02	0,03	0,00	0,08	
	Hipocampo	10	0,03	0,01	0,03	0,00	0,04	
CpG 18	Córtex Auditivo	10	0,02	0,02	0,02	0,00	0,07	0,66
	Córtex Entorrinal	10	0,03	0,03	0,02	0,00	0,10	
	Hipocampo	10	0,02	0,02	0,01	0,00	0,07	
CpG 19 e 20	Córtex Auditivo	10	0,06	0,01	0,06	0,04	0,08	0,22
	Córtex Entorrinal	10	0,05	0,02	0,06	0,00	0,08	
	Hipocampo	10	0,07	0,03	0,06	0,05	0,11	
CpG 22	Córtex Auditivo	10	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,38
	Córtex Entorrinal	9	0,01	0,01	0,01	0,00	0,04	
	Hipocampo	10	0,02	0,01	0,02	0,01	0,04	

N: Número de indivíduos; p*: teste t de Student; CA: Córtex Auditivo; CE: Cortex Entorrinal; DA: Doença de Alzheimer.

ANEXO 15: Metilação de CpGs do gene HSPA8 no cérebro de pacientes com DA e idosos.

Cérebro	Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	p*
CpG 1	DA	36	0,02	0,01	0,02	0,00	0,04	0,45
	Idosos	30	0,02	0,01	0,02	0,01	0,03	
CpG 2, 3 e 4	DA	36	0,04	0,03	0,04	0,00	0,14	0,91
	Idosos	30	0,04	0,03	0,03	0,01	0,12	
CpG 6	DA	35	0,01	0,01	0,01	0,00	0,03	0,57
	Idosos	30	0,01	0,01	0,01	0,00	0,03	
CpG 7, 8, 9, 10 e 11	DA	34	0,09	0,04	0,09	0,04	0,20	0,20
	Idosos	30	0,08	0,03	0,08	0,03	0,18	
CpG 12	DA	36	0,01	0,01	0,01	0,00	0,02	0,97
	Idosos	30	0,01	0,01	0,01	0,00	0,02	
CpG 13 e 14	DA	36	0,05	0,02	0,05	0,00	0,09	0,32
	Idosos	29	0,05	0,02	0,05	0,02	0,09	
CpG 15	DA	36	0,05	0,06	0,03	0,00	0,32	0,08
	Idosos	30	0,03	0,02	0,03	0,00	0,08	
CpG 18	DA	35	0,02	0,03	0,01	0,00	0,09	0,57
	Idosos	30	0,02	0,02	0,02	0,00	0,10	
CpG 19 e 20	DA	35	0,05	0,02	0,06	0,00	0,08	0,10
	Idosos	30	0,06	0,02	0,06	0,00	0,11	
CpG 22	DA	33	0,01	0,01	0,01	0,00	0,03	0,47
	Idosos	29	0,02	0,01	0,01	0,00	0,04	

N: Número de indivíduos; p*: teste t de Student; DA: Doença de Alzheimer.

ANEXO 16: Metilação de CpGs do gene *HSPA8* entre sangue periférico e cérebro de pacientes com DA e idosos.

DA		N	Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	p*
CpG 1	Cérebro	36	0,02	0,01	0,02	0,00	0,04	0,72
	Sangue	22	0,02	0,01	0,02	0,00	0,05	
CpG 2, 3 e 4	Cérebro	36	0,04	0,03	0,04	0,00	0,14	0,12
	Sangue	24	0,03	0,02	0,03	0,00	0,08	
CpG 6	Cérebro	35	0,01	0,01	0,01	0,00	0,03	0,64
	Sangue	23	0,01	0,01	0,01	0,00	0,04	
CpG 7, 8, 9, 10 e 11	Cérebro	34	0,09	0,04	0,09	0,04	0,20	0,53
	Sangue	23	0,09	0,04	0,08	0,03	0,18	
CpG 12	Cérebro	36	0,01	0,01	0,01	0,00	0,02	0,53
	Sangue	24	0,01	0,01	0,01	0,00	0,02	
CpG 13 e 14	Cérebro	36	0,05	0,02	0,05	0,00	0,09	0,91
	Sangue	22	0,05	0,02	0,05	0,01	0,08	
CpG 15	Cérebro	36	0,05	0,06	0,03	0,00	0,32	0,96
	Sangue	24	0,05	0,05	0,03	0,00	0,29	
CpG 18	Cérebro	35	0,02	0,03	0,01	0,00	0,09	0,95
	Sangue	22	0,02	0,03	0,01	0,00	0,12	
CpG 19 e 20	Cérebro	35	0,05	0,02	0,06	0,00	0,08	0,02
	Sangue	24	0,08	0,06	0,06	0,00	0,33	
CpG 22	Cérebro	33	0,01	0,01	0,01	0,00	0,03	0,60
	Sangue	23	0,02	0,01	0,01	0,00	0,05	

Idosos		N	Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	p*
CpG 1	Cérebro	30	0,02	0,01	0,02	0,01	0,03	<0,001
	Sangue	13	0,00	0,01	0,00	0,00	0,02	
CpG 2, 3 e 4	Cérebro	30	0,04	0,03	0,03	0,01	0,12	0,04
	Sangue	11	0,02	0,03	0,01	0,00	0,09	
CpG 6	Cérebro	30	0,01	0,01	0,01	0,00	0,03	0,32
	Sangue	14	0,02	0,01	0,01	0,00	0,04	
CpG 7, 8, 9, 10 e 11	Cérebro	30	0,08	0,03	0,08	0,03	0,18	0,04
	Sangue	10	0,16	0,11	0,17	0,01	0,30	
CpG 12	Cérebro	30	0,01	0,01	0,01	0,00	0,02	0,12
	Sangue	12	0,01	0,01	0,00	0,00	0,04	
CpG 13 e 14	Cérebro	29	0,05	0,02	0,05	0,02	0,09	0,002
	Sangue	7	0,03	0,02	0,01	0,01	0,07	
CpG 15	Cérebro	30	0,03	0,02	0,03	0,00	0,08	0,01
	Sangue	12	0,12	0,10	0,08	0,00	0,26	
CpG 18	Cérebro	30	0,02	0,02	0,02	0,00	0,10	0,01
	Sangue	13	0,06	0,05	0,07	0,00	0,17	
CpG 19 e 20	Cérebro	30	0,06	0,02	0,06	0,00	0,11	0,61
	Sangue	9	0,08	0,12	0,02	0,00	0,30	
CpG 22	Cérebro	29	0,02	0,01	0,01	0,00	0,04	0,16
	Sangue	10	0,01	0,01	0,00	0,00	0,04	

N: Número de indivíduos; p*: teste t de Student; DA: Doença de Alzheimer.

ANEXO 17: Metilação de CpGs do gene *HSPA9* no sangue periférico de pacientes com DA, idosos e jovens.

Sangue	Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	p*	Post hoc
CpG 1	DA	28	0,02	0,02	0,01	0,00	0,07	0,03	DA x Idosos p=0,03
	Idosos	18	0,03	0,02	0,02	0,01	0,07		
	Jovem	18	0,02	0,01	0,02	0,00	0,03		
CpG 2 e 3	DA	29	0,12	0,03	0,12	0,06	0,20	0,01	DA x Idosos p=0,01
	Idosos	17	0,15	0,02	0,14	0,12	0,20		
	Jovem	17	0,14	0,03	0,14	0,10	0,18		
CpG 6, 7, 8, 9 e 10	DA	30	0,05	0,02	0,06	0,01	0,09	0,002	DA x Jovem p=0,01 DA x Idosos p=0,02
	Idosos	19	0,07	0,03	0,07	0,00	0,13		
	Jovem	18	0,08	0,02	0,08	0,01	0,13		
CpG 11	DA	28	0,04	0,05	0,02	0,00	0,16	0,70	
	Idosos	19	0,05	0,03	0,04	0,00	0,12		
	Jovem	18	0,04	0,03	0,05	0,00	0,09		
CpG 12 e 13	DA	29	0,02	0,02	0,02	0,00	0,06	0,79	
	Idosos	19	0,02	0,01	0,02	0,00	0,04		
	Jovem	18	0,02	0,02	0,02	0,00	0,05		
CpG 14	DA	28	0,03	0,01	0,03	0,00	0,06	0,01	DA x Jovem p=0,01
	Idosos	15	0,04	0,02	0,04	0,00	0,06		
	Jovem	18	0,05	0,02	0,04	0,03	0,08		
CpG 15	DA	29	0,01	0,01	0,01	0,00	0,05	0,19	
	Idosos	18	0,01	0,01	0,01	0,00	0,03		
	Jovem	18	0,01	0,01	0,01	0,00	0,05		
CpG 16 e 17	DA	29	0,01	0,01	0,01	0,00	0,03	0,93	
	Idosos	18	0,01	0,01	0,01	0,00	0,02		
	Jovem	17	0,01	0,00	0,01	0,01	0,02		
CpG 19 e 20	DA	29	0,03	0,04	0,02	0,00	0,18	0,11	
	Idosos	17	0,06	0,05	0,04	0,00	0,18		
	Jovem	18	0,06	0,03	0,05	0,02	0,11		
CpG 21 e 22	DA	30	0,15	0,05	0,16	0,05	0,26	0,06	
	Idosos	18	0,17	0,04	0,17	0,06	0,25		
	Jovem	18	0,19	0,04	0,19	0,04	0,25		
CpG 23 e 24	DA	27	0,07	0,03	0,07	0,00	0,12	0,73	
	Idosos	18	0,07	0,03	0,07	0,00	0,15		
	Jovem	18	0,07	0,02	0,07	0,01	0,11		
CpG 25	DA	24	0,03	0,03	0,02	0,00	0,14	0,57	
	Idosos	19	0,03	0,03	0,02	0,00	0,12		
	Jovem	17	0,02	0,02	0,02	0,00	0,07		
CpG 27, 28, 29 e 30	DA	30	0,06	0,02	0,07	0,01	0,10	0,30	
	Idosos	18	0,05	0,03	0,05	0,00	0,11		
	Jovem	18	0,06	0,03	0,07	0,00	0,12		
CpG 31	DA	28	0,04	0,01	0,04	0,02	0,06	0,42	
	Idosos	16	0,04	0,01	0,04	0,03	0,05		
	Jovem	18	0,04	0,01	0,04	0,03	0,06		
CpG 32, 33 e 34	DA	30	0,03	0,01	0,03	0,00	0,06	0,98	
	Idosos	17	0,03	0,02	0,02	0,00	0,06		
	Jovem	18	0,03	0,01	0,02	0,00	0,05		

N: Número de indivíduos; p*: teste ANOVA; DA: Doença de Alzheimer.

ANEXO 18: Tabela - Metilação de CpGs do gene *HSPA9* nas três regiões cerebrais do grupo de pacientes com DA e idosos controles.

Auditivo		N	Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	p*
CpG 1	DA	11	0,01	0,01	0,01	0,01	0,04	0,93
	Idosos	10	0,01	0,01	0,01	0,00	0,03	
CpG 2 e 3	DA	11	0,13	0,02	0,12	0,10	0,17	0,81
	Idosos	10	0,14	0,04	0,13	0,09	0,19	
CpG 6, 7, 8, 9 e 10	DA	11	0,07	0,02	0,07	0,05	0,11	0,11
	Idosos	10	0,06	0,03	0,06	0,02	0,11	
CpG 11	DA	9	0,02	0,03	0,00	0,00	0,10	0,57
	Idosos	10	0,03	0,03	0,02	0,00	0,08	
CpG 12 e 13	DA	11	0,02	0,01	0,02	0,01	0,03	0,33
	Idosos	10	0,02	0,02	0,02	0,00	0,06	
CpG 14	DA	10	0,04	0,01	0,04	0,02	0,05	0,86
	Idosos	10	0,04	0,02	0,04	0,00	0,05	
CpG 15	DA	11	0,01	0,01	0,01	0,00	0,02	0,76
	Idosos	10	0,01	0,01	0,01	0,00	0,02	
CpG 16 e 17	DA	10	0,01	0,01	0,01	0,00	0,02	0,61
	Idosos	9	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	
CpG 19 e 20	DA	11	0,02	0,01	0,02	0,01	0,04	0,04
	Idosos	10	0,01	0,01	0,01	0,00	0,04	
CpG 21 e 22	DA	11	0,15	0,04	0,17	0,06	0,19	0,95
	Idosos	10	0,15	0,03	0,15	0,11	0,21	
CpG 23 e 24	DA	11	0,07	0,03	0,07	0,00	0,12	0,95
	Idosos	10	0,07	0,02	0,08	0,04	0,10	
CpG 25	DA	10	0,02	0,02	0,02	0,00	0,05	0,31
	Idosos	10	0,03	0,03	0,03	0,00	0,06	
CpG 27, 28, 29 e 30	DA	11	0,07	0,03	0,06	0,00	0,11	0,73
	Idosos	10	0,07	0,03	0,07	0,01	0,11	
CpG 31	DA	11	0,04	0,01	0,04	0,03	0,05	0,48
	Idosos	10	0,04	0,01	0,04	0,03	0,05	
CpG 32, 33 e 34	DA	11	0,02	0,01	0,02	0,01	0,05	0,66
	Idosos	10	0,03	0,01	0,02	0,01	0,06	

Entorrinal		N	Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	p*
CpG 1	DA	12	0,01	0,01	0,01	0,00	0,03	0,54
	Idosos	10	0,01	0,01	0,02	0,00	0,02	
CpG 2 e 3	DA	12	0,13	0,02	0,12	0,10	0,18	0,31
	Idosos	10	0,14	0,03	0,14	0,10	0,21	
CpG 6, 7, 8, 9 e 10	DA	12	0,06	0,03	0,07	0,01	0,10	0,73
	Idosos	10	0,06	0,02	0,07	0,02	0,09	
CpG 11	DA	12	0,04	0,04	0,04	0,00	0,13	0,39
	Idosos	10	0,03	0,03	0,03	0,00	0,07	
CpG 12 e 13	DA	12	0,02	0,01	0,02	0,00	0,03	0,29
	Idosos	10	0,01	0,01	0,01	0,00	0,03	
CpG 14	DA	12	0,04	0,01	0,04	0,02	0,07	0,05
	Idosos	10	0,03	0,01	0,03	0,00	0,05	
CpG 15	DA	12	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01	0,30
	Idosos	10	0,01	0,01	0,01	0,00	0,02	
CpG 16 e 17	DA	12	0,02	0,01	0,02	0,01	0,02	0,71
	Idosos	10	0,02	0,01	0,02	0,01	0,03	
CpG 19 e 20	DA	12	0,03	0,05	0,02	0,00	0,19	0,47
	Idosos	10	0,02	0,01	0,02	0,00	0,04	
CpG 21 e 22	DA	12	0,13	0,04	0,14	0,06	0,19	0,96
	Idosos	10	0,13	0,05	0,14	0,05	0,20	
CpG 23 e 24	DA	12	0,08	0,02	0,09	0,04	0,11	0,26
	Idosos	10	0,07	0,03	0,08	0,02	0,10	
CpG 25	DA	12	0,02	0,02	0,02	0,00	0,07	0,64
	Idosos	10	0,03	0,02	0,03	0,00	0,06	
CpG 27, 28, 29 e 30	DA	12	0,07	0,03	0,08	0,03	0,09	0,24
	Idosos	10	0,06	0,02	0,06	0,01	0,08	
CpG 31	DA	12	0,04	0,01	0,04	0,03	0,05	0,96
	Idosos	10	0,04	0,01	0,04	0,03	0,05	
CpG 32, 33 e 34	DA	11	0,02	0,01	0,02	0,02	0,03	0,10
	Idosos	10	0,02	0,01	0,02	0,01	0,03	

continua

continuação

Hipocampo		N	Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	p*
CpG 1	DA	12	0,02	0,01	0,02	0,01	0,03	0,78
	Idosos	10	0,02	0,01	0,01	0,01	0,03	
CpG 2 e 3	DA	12	0,12	0,02	0,12	0,09	0,16	0,07
	Idosos	10	0,14	0,02	0,13	0,11	0,17	
CpG 6, 7, 8, 9 e 10	DA	12	0,07	0,02	0,07	0,05	0,13	0,29
	Idosos	10	0,06	0,02	0,07	0,03	0,09	
CpG 11	DA	12	0,07	0,05	0,08	0,00	0,13	0,07
	Idosos	9	0,04	0,02	0,03	0,00	0,08	
CpG 12 e 13	DA	12	0,02	0,01	0,02	0,01	0,04	0,09
	Idosos	10	0,01	0,01	0,01	0,00	0,02	
CpG 14	DA	12	0,04	0,01	0,04	0,02	0,06	0,24
	Idosos	10	0,03	0,01	0,03	0,02	0,04	
CpG 15	DA	12	0,01	0,01	0,01	0,00	0,02	0,79
	Idosos	10	0,01	0,01	0,01	0,00	0,03	
CpG 16 e 17	DA	11	0,01	0,01	0,01	0,00	0,03	0,84
	Idosos	9	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	
CpG 19 e 20	DA	12	0,03	0,01	0,02	0,01	0,05	0,42
	Idosos	10	0,02	0,02	0,02	0,00	0,05	
CpG 21 e 22	DA	12	0,16	0,06	0,18	0,05	0,23	0,29
	Idosos	10	0,13	0,06	0,15	0,05	0,20	
CpG 23 e 24	DA	12	0,08	0,01	0,08	0,06	0,09	0,70
	Idosos	10	0,08	0,01	0,08	0,05	0,10	
CpG 25	DA	12	0,02	0,02	0,02	0,00	0,07	0,82
	Idosos	10	0,02	0,02	0,02	0,00	0,06	
CpG 27, 28, 29 e 30	DA	12	0,07	0,02	0,08	0,05	0,09	0,98
	Idosos	10	0,07	0,02	0,07	0,04	0,10	
CpG 31	DA	12	0,04	0,01	0,04	0,03	0,06	0,92
	Idosos	10	0,04	0,01	0,04	0,02	0,05	
CpG 32, 33 e 34	DA	12	0,03	0,01	0,02	0,01	0,04	0,80
	Idosos	10	0,02	0,01	0,02	0,01	0,04	

N: Número de indivíduos; p*: teste t de Student; DA: Doença de Alzheimer.

ANEXO 19: Tabela - Metilação de CpGs do gene *HSPA9* entre as três regiões cerebrais de pacientes com DA e de idosos controles.

DA	Região Cerebral	N	Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	p*	Post hoc
CpG 1	Córtex Auditivo	11	0,01	0,01	0,01	0,01	0,04	0,32	
	Córtex Entorrinal	12	0,01	0,01	0,01	0,00	0,03		
	Hipocampo	12	0,02	0,01	0,02	0,01	0,03		
CpG 2 e 3	Córtex Auditivo	11	0,13	0,02	0,12	0,10	0,17	0,42	
	Córtex Entorrinal	12	0,13	0,02	0,12	0,10	0,18		
	Hipocampo	12	0,12	0,02	0,12	0,09	0,16		
CpG 6, 7, 8, 9 e 10	Córtex Auditivo	11	0,07	0,02	0,07	0,05	0,11	0,28	
	Córtex Entorrinal	12	0,06	0,03	0,07	0,01	0,10		
	Hipocampo	12	0,07	0,02	0,07	0,05	0,13		
CpG 11	Córtex Auditivo	9	0,02	0,03	0,00	0,00	0,10	0,03	A x H p=0,03
	Córtex Entorrinal	12	0,04	0,04	0,04	0,00	0,13		
	Hipocampo	12	0,07	0,05	0,08	0,00	0,13		
CpG 12 e 13	Córtex Auditivo	11	0,02	0,01	0,02	0,01	0,03	0,78	
	Córtex Entorrinal	12	0,02	0,01	0,02	0,00	0,03		
	Hipocampo	12	0,02	0,01	0,02	0,01	0,04		
CpG 14	Córtex Auditivo	10	0,04	0,01	0,04	0,02	0,05	0,18	
	Córtex Entorrinal	12	0,04	0,01	0,04	0,02	0,07		
	Hipocampo	12	0,04	0,01	0,04	0,02	0,06		
CpG 15	Córtex Auditivo	11	0,01	0,01	0,01	0,00	0,02	0,66	
	Córtex Entorrinal	12	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01		
	Hipocampo	12	0,01	0,01	0,01	0,00	0,02		
CpG 16 e 17	Córtex Auditivo	10	0,01	0,01	0,01	0,00	0,02	0,67	
	Córtex Entorrinal	12	0,02	0,01	0,02	0,01	0,02		
	Hipocampo	11	0,01	0,01	0,01	0,00	0,03		
CpG 19 e 20	Córtex Auditivo	11	0,02	0,01	0,02	0,01	0,04	0,74	
	Córtex Entorrinal	12	0,03	0,05	0,02	0,00	0,19		
	Hipocampo	12	0,03	0,01	0,02	0,01	0,05		
CpG 21 e 22	Córtex Auditivo	11	0,15	0,04	0,17	0,06	0,19	0,34	
	Córtex Entorrinal	12	0,13	0,04	0,14	0,06	0,19		
	Hipocampo	12	0,16	0,06	0,18	0,05	0,23		
CpG 23 e 24	Córtex Auditivo	11	0,07	0,03	0,07	0,00	0,12	0,55	
	Córtex Entorrinal	12	0,08	0,02	0,09	0,04	0,11		
	Hipocampo	12	0,08	0,01	0,08	0,06	0,09		
CpG 25	Córtex Auditivo	10	0,02	0,02	0,02	0,00	0,05	0,91	
	Córtex Entorrinal	12	0,02	0,02	0,02	0,00	0,07		
	Hipocampo	12	0,02	0,02	0,02	0,00	0,07		
CpG 27, 28, 29 e 30	Córtex Auditivo	11	0,07	0,03	0,06	0,00	0,11	0,86	
	Córtex Entorrinal	12	0,07	0,03	0,08	0,03	0,09		
	Hipocampo	12	0,07	0,02	0,08	0,05	0,09		
CpG 31	Córtex Auditivo	11	0,04	0,01	0,04	0,03	0,05	0,86	
	Córtex Entorrinal	12	0,04	0,01	0,04	0,03	0,05		
	Hipocampo	12	0,04	0,01	0,04	0,03	0,06		
CpG 32, 33 e 34	Córtex Auditivo	11	0,02	0,01	0,02	0,01	0,05	0,99	
	Córtex Entorrinal	11	0,02	0,01	0,02	0,02	0,03		
	Hipocampo	12	0,03	0,01	0,02	0,01	0,04		

continua

continuação

Idosos	Região Cerebral	N	Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	p*
CpG 1	Córtex Auditivo	10	0,01	0,01	0,01	0,00	0,03	0,85
	Córtex Entorrinal	10	0,01	0,01	0,02	0,00	0,02	
	Hipocampo	10	0,02	0,01	0,01	0,01	0,03	
CpG 2 e 3	Córtex Auditivo	10	0,14	0,04	0,13	0,09	0,19	0,88
	Córtex Entorrinal	10	0,14	0,03	0,14	0,10	0,21	
	Hipocampo	10	0,14	0,02	0,13	0,11	0,17	
CpG 6, 7, 8, 9 e 10	Córtex Auditivo	10	0,06	0,03	0,06	0,02	0,11	0,77
	Córtex Entorrinal	10	0,06	0,02	0,07	0,02	0,09	
	Hipocampo	10	0,06	0,02	0,07	0,03	0,09	
CpG 11	Córtex Auditivo	10	0,03	0,03	0,02	0,00	0,08	0,65
	Córtex Entorrinal	10	0,03	0,03	0,03	0,00	0,07	
	Hipocampo	9	0,04	0,02	0,03	0,00	0,08	
CpG 12 e 13	Córtex Auditivo	10	0,02	0,02	0,02	0,00	0,06	0,09
	Córtex Entorrinal	10	0,01	0,01	0,01	0,00	0,03	
	Hipocampo	10	0,01	0,01	0,01	0,00	0,02	
CpG 14	Córtex Auditivo	10	0,04	0,02	0,04	0,00	0,05	0,59
	Córtex Entorrinal	10	0,03	0,01	0,03	0,00	0,05	
	Hipocampo	10	0,03	0,01	0,03	0,02	0,04	
CpG 15	Córtex Auditivo	10	0,01	0,01	0,01	0,00	0,02	0,82
	Córtex Entorrinal	10	0,01	0,01	0,01	0,00	0,02	
	Hipocampo	10	0,01	0,01	0,01	0,00	0,03	
CpG 16 e 17	Córtex Auditivo	9	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,61
	Córtex Entorrinal	10	0,02	0,01	0,02	0,01	0,03	
	Hipocampo	9	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	
CpG 19 e 20	Córtex Auditivo	10	0,01	0,01	0,01	0,00	0,04	0,40
	Córtex Entorrinal	10	0,02	0,01	0,02	0,00	0,04	
	Hipocampo	10	0,02	0,02	0,02	0,00	0,05	
CpG 21 e 22	Córtex Auditivo	10	0,15	0,03	0,15	0,11	0,21	0,55
	Córtex Entorrinal	10	0,13	0,05	0,14	0,05	0,20	
	Hipocampo	10	0,13	0,06	0,15	0,05	0,20	
CpG 23 e 24	Córtex Auditivo	10	0,07	0,02	0,08	0,04	0,10	0,78
	Córtex Entorrinal	10	0,07	0,03	0,08	0,02	0,10	
	Hipocampo	10	0,08	0,01	0,08	0,05	0,10	
CpG 25	Córtex Auditivo	10	0,03	0,03	0,03	0,00	0,06	0,57
	Córtex Entorrinal	10	0,03	0,02	0,03	0,00	0,06	
	Hipocampo	10	0,02	0,02	0,02	0,00	0,06	
CpG 27, 28, 29 e 30	Córtex Auditivo	10	0,07	0,03	0,07	0,01	0,11	0,35
	Córtex Entorrinal	10	0,06	0,02	0,06	0,01	0,08	
	Hipocampo	10	0,07	0,02	0,07	0,04	0,10	
CpG 31	Córtex Auditivo	10	0,04	0,01	0,04	0,03	0,05	0,94
	Córtex Entorrinal	10	0,04	0,01	0,04	0,03	0,05	
	Hipocampo	10	0,04	0,01	0,04	0,02	0,05	
CpG 32, 33 e 34	Córtex Auditivo	10	0,03	0,01	0,02	0,01	0,06	0,35
	Córtex Entorrinal	10	0,02	0,01	0,02	0,01	0,03	
	Hipocampo	10	0,02	0,01	0,02	0,01	0,04	

N: Número de indivíduos; p*: teste ANOVA; DA: Doença de Alzheimer.

ANEXO 20: Metilação de CpGs do gene *HSPA9* no cérebro de pacientes com DA e idosos.

Cérebro	Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	p*
CpG 1	DA	35	0,01	0,01	0,01	0,00	0,04	0,77
	Idosos	30	0,01	0,01	0,01	0,00	0,03	
CpG 2 e 3	DA	35	0,13	0,02	0,12	0,09	0,18	0,12
	Idosos	30	0,14	0,03	0,13	0,09	0,21	
CpG 6, 7, 8, 9 e 10	DA	35	0,07	0,02	0,07	0,01	0,13	0,20
	Idosos	30	0,06	0,02	0,06	0,02	0,11	
CpG 11	DA	33	0,05	0,05	0,04	0,00	0,13	0,10
	Idosos	29	0,03	0,03	0,03	0,00	0,08	
CpG 12 e 13	DA	35	0,02	0,01	0,02	0,00	0,04	0,42
	Idosos	30	0,02	0,01	0,01	0,00	0,06	
CpG 14	DA	34	0,04	0,01	0,04	0,02	0,07	0,07
	Idosos	30	0,03	0,01	0,03	0,00	0,05	
CpG 15	DA	35	0,01	0,01	0,01	0,00	0,02	0,57
	Idosos	30	0,01	0,01	0,01	0,00	0,03	
CpG 16 e 17	DA	33	0,01	0,01	0,01	0,00	0,03	0,53
	Idosos	28	0,01	0,01	0,01	0,01	0,03	
CpG 19 e 20	DA	35	0,03	0,03	0,02	0,00	0,19	0,14
	Idosos	30	0,02	0,01	0,02	0,00	0,05	
CpG 21 e 22	DA	35	0,15	0,05	0,16	0,05	0,23	0,41
	Idosos	30	0,14	0,05	0,14	0,05	0,21	
CpG 23 e 24	DA	35	0,08	0,02	0,08	0,00	0,12	0,35
	Idosos	30	0,07	0,02	0,08	0,02	0,10	
CpG 25	DA	34	0,02	0,02	0,02	0,00	0,07	0,44
	Idosos	30	0,02	0,02	0,02	0,00	0,06	
CpG 27, 28, 29 e 30	DA	35	0,07	0,02	0,07	0,00	0,11	0,66
	Idosos	30	0,07	0,02	0,07	0,01	0,11	
CpG 31	DA	35	0,04	0,01	0,04	0,03	0,06	0,64
	Idosos	30	0,04	0,01	0,04	0,02	0,05	
CpG 32, 33 e 34	DA	34	0,02	0,01	0,02	0,01	0,05	0,67
	Idosos	30	0,02	0,01	0,02	0,01	0,06	

N: Número de indivíduos; p*: teste t de Student; DA: Doença de Alzheimer.

ANEXO 21: Metilação de CpGs do gene *HSPA9* entre sangue periférico e cérebro de pacientes com DA e idosos.

DA	Tecido	N	Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	p*
CpG 1	Cérebro	35	0,01	0,01	0,01	0,00	0,04	0,43
	Sangue	28	0,02	0,02	0,01	0,00	0,07	
CpG 2 e 3	Cérebro	35	0,13	0,02	0,12	0,09	0,18	0,67
	Sangue	29	0,12	0,03	0,12	0,06	0,20	
CpG 6, 7, 8, 9 e 10	Cérebro	35	0,07	0,02	0,07	0,01	0,13	0,01
	Sangue	30	0,05	0,02	0,06	0,01	0,09	
CpG 11	Cérebro	33	0,05	0,05	0,04	0,00	0,13	0,69
	Sangue	28	0,04	0,05	0,02	0,00	0,16	
CpG 12 e 13	Cérebro	35	0,02	0,01	0,02	0,00	0,04	0,20
	Sangue	29	0,02	0,02	0,02	0,00	0,06	
CpG 14	Cérebro	34	0,04	0,01	0,04	0,02	0,07	0,06
	Sangue	28	0,03	0,01	0,03	0,00	0,06	
CpG 15	Cérebro	35	0,01	0,01	0,01	0,00	0,02	0,13
	Sangue	29	0,01	0,01	0,01	0,00	0,05	
CpG 16 e 17	Cérebro	33	0,01	0,01	0,01	0,00	0,03	0,81
	Sangue	29	0,01	0,01	0,01	0,00	0,03	
CpG 19 e 20	Cérebro	35	0,03	0,03	0,02	0,00	0,19	0,47
	Sangue	29	0,03	0,04	0,02	0,00	0,18	
CpG 21 e 22	Cérebro	35	0,15	0,05	0,16	0,05	0,23	0,59
	Sangue	30	0,15	0,05	0,16	0,05	0,26	
CpG 23 e 24	Cérebro	35	0,08	0,02	0,08	0,00	0,12	0,05
	Sangue	27	0,07	0,03	0,07	0,00	0,12	
CpG 25	Cérebro	34	0,02	0,02	0,02	0,00	0,07	0,14
	Sangue	24	0,03	0,03	0,02	0,00	0,14	
CpG 27, 28, 29 e 30	Cérebro	35	0,07	0,02	0,07	0,00	0,11	0,32
	Sangue	30	0,06	0,02	0,07	0,01	0,10	
CpG 31	Cérebro	35	0,04	0,01	0,04	0,03	0,06	0,53
	Sangue	28	0,04	0,01	0,04	0,02	0,06	
CpG 32, 33 e 34	Cérebro	34	0,02	0,01	0,02	0,01	0,05	0,80
	Sangue	30	0,03	0,01	0,03	0,00	0,06	

Idosos	Tecido	N	Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	p*
CpG 1	Cérebro	30	0,01	0,01	0,01	0,00	0,03	0,003
	Sangue	18	0,03	0,02	0,02	0,01	0,07	
CpG 2 e 3	Cérebro	30	0,14	0,03	0,13	0,09	0,21	0,18
	Sangue	17	0,15	0,02	0,14	0,12	0,20	
CpG 6, 7, 8, 9 e 10	Cérebro	30	0,06	0,02	0,06	0,02	0,11	0,08
	Sangue	19	0,07	0,03	0,07	0,00	0,13	
CpG 11	Cérebro	29	0,03	0,03	0,03	0,00	0,08	0,03
	Sangue	19	0,05	0,03	0,04	0,00	0,12	
CpG 12 e 13	Cérebro	30	0,02	0,01	0,01	0,00	0,06	0,29
	Sangue	19	0,02	0,01	0,02	0,00	0,04	
CpG 14	Cérebro	30	0,03	0,01	0,03	0,00	0,05	0,11
	Sangue	15	0,04	0,02	0,04	0,00	0,06	
CpG 15	Cérebro	30	0,01	0,01	0,01	0,00	0,03	0,24
	Sangue	18	0,01	0,01	0,01	0,00	0,03	
CpG 16 e 17	Cérebro	28	0,01	0,01	0,01	0,01	0,03	0,46
	Sangue	18	0,01	0,01	0,01	0,00	0,02	
CpG 19 e 20	Cérebro	30	0,02	0,01	0,02	0,00	0,05	0,01
	Sangue	17	0,06	0,05	0,04	0,00	0,18	
CpG 21 e 22	Cérebro	30	0,14	0,05	0,14	0,05	0,21	0,03
	Sangue	18	0,17	0,04	0,17	0,06	0,25	
CpG 23 e 24	Cérebro	30	0,07	0,02	0,08	0,02	0,10	0,67
	Sangue	18	0,07	0,03	0,07	0,00	0,15	
CpG 25	Cérebro	30	0,02	0,02	0,02	0,00	0,06	0,42
	Sangue	19	0,03	0,03	0,02	0,00	0,12	
CpG 27, 28, 29 e 30	Cérebro	30	0,07	0,02	0,07	0,01	0,11	0,06
	Sangue	18	0,05	0,03	0,05	0,00	0,11	
CpG 31	Cérebro	30	0,04	0,01	0,04	0,02	0,05	0,06
	Sangue	16	0,04	0,01	0,04	0,03	0,05	
CpG 32, 33 e 34	Cérebro	30	0,02	0,01	0,02	0,01	0,06	0,71
	Sangue	17	0,03	0,02	0,02	0,00	0,06	

N: Número de indivíduos; p*: teste t de Student; DA: Doença de Alzheimer.

8 REFERÊNCIAS

1. Abbott A. Dementia: a problem for our age. *Nature*. 2011 Jul 14;475(7355):S2-4.
2. Secretariat PDoDoEaSAotUN. WORLD POPULATION PROSPECTS: THE 2008 REVISION. NEW YORK: UNITED NATIONS. 2009.
3. Chouliaras L, Rutten BP, Kenis G, Peerbooms O, Visser PJ, Verhey F, et al. Epigenetic regulation in the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Progress in neurobiology*. 2010 Apr;90(4):498-510.
4. Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E. Alzheimer's disease. *Lancet*. 2011 Mar 19;377(9770):1019-31.
5. Bertram L, Tanzi RE. Thirty years of Alzheimer's disease genetics: the implications of systematic meta-analyses. *Nature reviews*. 2008 Oct;9(10):768-78.
6. Bertram L, Tanzi RE. The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. *The Journal of clinical investigation*. 2005 Jun;115(6):1449-57.
7. Iraola-Guzman S, Estivill X, Rabionet R. DNA methylation in neurodegenerative disorders: a missing link between genome and environment? *Clinical genetics*. 2011 Jul;80(1):1-14.
8. Williams R. Biomarkers: warning signs. *Nature*. 2011 Jul 14;475(7355):S5-7.
9. Chuang JC, Jones PA. Epigenetics and microRNAs. *Pediatr Res*. 2007 May;61(5 Pt 2):24R-9R.
10. Tremolizzo L, Rodriguez-Menendez V, Brighina L, Ferrarese C. Is the inverse association between Alzheimer's disease and cancer the result of a different propensity to methylate DNA? *Med Hypotheses*. 2006;66(6):1251-2.
11. Fuso A, Seminara L, Cavallaro RA, D'Anselmi F, Scarpa S. S-adenosylmethionine/homocysteine cycle alterations modify DNA methylation status with consequent deregulation of PS1 and BACE and beta-amyloid production. *Mol Cell Neurosci*. 2005 Jan;28(1):195-204.
12. Barrachina M, Ferrer I. DNA methylation of Alzheimer disease and tauopathy-related genes in postmortem brain. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2009 Aug;68(8):880-91.
13. Farooqui T, Farooqui AA. Aging: an important factor for the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Mechanisms of ageing and development*. 2009 Apr;130(4):203-15.
14. IBGE IBDGEE-. INDICADORES SOCIODEMOGRÁFICOS E DE SAÚDE NO BRASIL. . RIO DE JANEIRO: IBGE. 2009.
15. Kawas CH, Corrada MM. Alzheimer's and dementia in the oldest-old: a century of challenges. *Current Alzheimer research*. 2006 Dec;3(5):411-9.
16. Savica R, Petersen RC. Prevention of dementia. *The Psychiatric clinics of North America*. 2011 Mar;34(1):127-45.
17. Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease. *Lancet*. 2006 Jul 29;368(9533):387-403.
18. Lambert JC, Amouyel P. Genetic heterogeneity of Alzheimer's disease: complexity and advances. *Psychoneuroendocrinology*. 2007 Aug;32 Suppl 1:S62-70.
19. Bertram L. Alzheimer's genetics in the GWAS era: a continuing story of 'replications and refutations'. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2011 Jun;11(3):246-53.

20. Herrera E, Jr., Caramelli P, Silveira AS, Nitrini R. Epidemiologic survey of dementia in a community-dwelling Brazilian population. *Alzheimer disease and associated disorders*. 2002 Apr-Jun;16(2):103-8.
21. Nitrini R, Caramelli P, Herrera E, Jr., Bahia VS, Caixeta LF, Radanovic M, et al. Incidence of dementia in a community-dwelling Brazilian population. *Alzheimer disease and associated disorders*. 2004 Oct-Dec;18(4):241-6.
22. Chaves ML, Camozzato AL, Godinho C, Piazenski I, Kaye J. Incidence of mild cognitive impairment and Alzheimer disease in Southern Brazil. *Journal of geriatric psychiatry and neurology*. 2009 Sep;22(3):181-7.
23. Scarmeas N, Luchsinger JA, Schupf N, Brickman AM, Cosentino S, Tang MX, et al. Physical activity, diet, and risk of Alzheimer disease. *Jama*. 2009 Aug 12;302(6):627-37.
24. Hakansson K, Rovio S, Helkala EL, Vilska AR, Winblad B, Soininen H, et al. Association between mid-life marital status and cognitive function in later life: population based cohort study. *BMJ (Clinical research ed)*. 2009;339:b2462.
25. Castegna A, Aksenov M, Thongboonkerd V, Klein JB, Pierce WM, Booze R, et al. Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part II: dihydropyrimidinase-related protein 2, alpha-enolase and heat shock cognate 71. *Journal of neurochemistry*. 2002 Sep;82(6):1524-32.
26. Petersen RC. Challenges of epidemiological studies of mild cognitive impairment. *Alzheimer disease and associated disorders*. 2004 Jan-Mar;18(1):1-2.
27. Gauthier S. Advances in the pharmacotherapy of Alzheimer's disease. *Cmaj*. 2002 Mar 5;166(5):616-23.
28. Gustaw-Rothenberg K, Lerner A, Bonda DJ, Lee HG, Zhu X, Perry G, et al. Biomarkers in Alzheimer's disease: past, present and future. *Biomarkers in medicine*. 2010 Feb;4(1):15-26.
29. Nussbaum RL, Ellis CE. Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *The New England journal of medicine*. 2003 Apr 3;348(14):1356-64.
30. Behrens MI, Lendon C, Roe CM. A common biological mechanism in cancer and Alzheimer's disease? *Current Alzheimer research*. 2009 Jun;6(3):196-204.
31. Karran E, Mercken M, De Strooper B. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 2011 Sep;10(9):698-712.
32. Green KN, Steffan JS, Martinez-Coria H, Sun X, Schreiber SS, Thompson LM, et al. Nicotinamide restores cognition in Alzheimer's disease transgenic mice via a mechanism involving sirtuin inhibition and selective reduction of Thr231-phosphotau. *J Neurosci*. 2008 Nov 5;28(45):11500-10.
33. Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, et al. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nature medicine*. 2008 Aug;14(8):837-42.
34. Braak H, Braak E. Staging of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neurobiology of aging*. 1995 May-Jun;16(3):271-8; discussion 8-84.
35. Narayan P, Dragunow M. Pharmacology of epigenetics in brain disorders. *British journal of pharmacology*. 2010 Jan 1;159(2):285-303.
36. Hampel H, Burger K, Teipel SJ, Bokde AL, Zetterberg H, Blennow K. Core candidate neurochemical and imaging biomarkers of Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement*. 2008 Jan;4(1):38-48.

37. Harris JA, Devidze N, Verret L, Ho K, Halabisky B, Thwin MT, et al. Transsynaptic progression of amyloid-beta-induced neuronal dysfunction within the entorhinal-hippocampal network. *Neuron*. 2010 Nov 4;68(3):428-41.
38. Scheuner D, Eckman C, Jensen M, Song X, Citron M, Suzuki N, et al. Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nature medicine*. 1996 Aug;2(8):864-70.
39. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*. 1993 Aug 13;261(5123):921-3.
40. Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*. 1991 Feb 21;349(6311):704-6.
41. Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, et al. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*. 1995 Jun 29;375(6534):754-60.
42. Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Liang Y, et al. Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature*. 1995 Aug 31;376(6543):775-8.
43. Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, et al. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science*. 1995 Aug 18;269(5226):973-7.
44. Harold D, Abraham R, Hollingworth P, Sims R, Gerrish A, Hamshere ML, et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nature genetics*. 2009 Oct;41(10):1088-93.
45. Seshadri S, Fitzpatrick AL, Ikram MA, DeStefano AL, Gudnason V, Boada M, et al. Genome-wide analysis of genetic loci associated with Alzheimer disease. *Jama*. 2010 May 12;303(18):1832-40.
46. Lambert JC, Heath S, Even G, Campion D, Sleegers K, Hiltunen M, et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nature genetics*. 2009 Oct;41(10):1094-9.
47. Naj AC, Beecham GW, Martin ER, Gallins PJ, Powell EH, Konidari I, et al. Dementia revealed: novel chromosome 6 locus for late-onset Alzheimer disease provides genetic evidence for folate-pathway abnormalities. *PLoS genetics*. 2010 Sep;6(9).
48. Grupe A, Abraham R, Li Y, Rowland C, Hollingworth P, Morgan A, et al. Evidence for novel susceptibility genes for late-onset Alzheimer's disease from a genome-wide association study of putative functional variants. *Human molecular genetics*. 2007 Apr 15;16(8):865-73.
49. Kehoe PG, Russ C, McIlroy S, Williams H, Holmans P, Holmes C, et al. Variation in DCP1, encoding ACE, is associated with susceptibility to Alzheimer disease. *Nature genetics*. 1999 Jan;21(1):71-2.
50. Gunther C, von Hadeln K, Muller-Thomsen T, Alberici A, Binetti G, Hock C, et al. Possible association of mitochondrial transcription factor A (TFAM) genotype with sporadic Alzheimer disease. *Neuroscience letters*. 2004 Oct 21;369(3):219-23.

51. Crawford FC, Freeman MJ, Schinka JA, Abdullah LI, Gold M, Hartman R, et al. A polymorphism in the cystatin C gene is a novel risk factor for late-onset Alzheimer's disease. *Neurology*. 2000 Sep 26;55(6):763-8.
52. Scherzer CR, Offe K, Gearing M, Rees HD, Fang G, Heilman CJ, et al. Loss of apolipoprotein E receptor LR11 in Alzheimer disease. *Archives of neurology*. 2004 Aug;61(8):1200-5.
53. Cook LJ, Ho LW, Taylor AE, Brayne C, Evans JG, Xuereb J, et al. Candidate gene association studies of the alpha 4 (CHRNA4) and beta 2 (CHRNA2) neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit genes in Alzheimer's disease. *Neuroscience letters*. 2004 Mar 25;358(2):142-6.
54. Grupe A, Li Y, Rowland C, Nowotny P, Hinrichs AL, Smemo S, et al. A scan of chromosome 10 identifies a novel locus showing strong association with late-onset Alzheimer disease. *American journal of human genetics*. 2006 Jan;78(1):78-88.
55. Mill J. Toward an integrated genetic and epigenetic approach to Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*. 2011 Jul;32(7):1188-91.
56. Baer-Dubowska W, Majchrzak-Celinska A, Cichocki M. Pharmacoeugenetics: a new approach to predicting individual drug responses and targeting new drugs. *Pharmacol Rep*. 2011;63(2):293-304.
57. Clark SJ, Statham A, Stirzaker C, Molloy PL, Frommer M. DNA methylation: bisulphite modification and analysis. *Nature protocols*. 2006;1(5):2353-64.
58. Lopez-Serra L, Esteller M. Proteins that bind methylated DNA and human cancer: reading the wrong words. *British journal of cancer*. 2008 Jun 17;98(12):1881-5.
59. Irizarry RA, Ladd-Acosta C, Wen B, Wu Z, Montano C, Onyango P, et al. The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nature genetics*. 2009 Feb;41(2):178-86.
60. Hellman A, Chess A. Gene body-specific methylation on the active X chromosome. *Science*. 2007 Feb 23;315(5815):1141-3.
61. Aisen PS. Interpreting biomarker data in therapeutic trials. *The journal of nutrition, health & aging*. 2009 Apr;13(4):337-8.
62. Rezai-Zadeh K, Gate D, Szekely CA, Town T. Can peripheral leukocytes be used as Alzheimer's disease biomarkers? Expert review of neurotherapeutics. 2009 Nov;9(11):1623-33.
63. Gomar JJ, Bobes-Bascaran MT, Conejero-Goldberg C, Davies P, Goldberg TE. Utility of combinations of biomarkers, cognitive markers, and risk factors to predict conversion from mild cognitive impairment to Alzheimer disease in patients in the Alzheimer's disease neuroimaging initiative. *Archives of general psychiatry*. 2011 Sep;68(9):961-9.
64. Scherzer CR. Chipping away at diagnostics for neurodegenerative diseases. *Neurobiology of disease*. 2009 Aug;35(2):148-56.
65. Einstein R. Commentary on "Developing a national strategy to prevent dementia: Leon Thal Symposium 2009." Developing a blood test for Alzheimer's disease using advanced genomic expression technology. *Alzheimers Dement*. 2010 Mar;6(2):147-9.
66. Cedazo-Minguez A, Winblad B. Biomarkers for Alzheimer's disease and other forms of dementia: clinical needs, limitations and future aspects. *Experimental gerontology*. 2010 Jan;45(1):5-14.
67. Thambisetty M, Lovestone S. Blood-based biomarkers of Alzheimer's disease: challenging but feasible. *Biomarkers in medicine*. 2010 Feb;4(1):65-79.

68. Fehlbauer-Beurdeley P, Jarrige-Le Prado AC, Pallares D, Carriere J, Guihal C, Soucaille C, et al. Toward an Alzheimer's disease diagnosis via high-resolution blood gene expression. *Alzheimers Dement*. 2010 Jan;6(1):25-38.
69. Maes OC, Xu S, Yu B, Chertkow HM, Wang E, Schipper HM. Transcriptional profiling of Alzheimer blood mononuclear cells by microarray. *Neurobiology of aging*. 2007 Dec;28(12):1795-809.
70. Maes OC, Schipper HM, Chertkow HM, Wang E. Methodology for discovery of Alzheimer's disease blood-based biomarkers. *The journals of gerontology*. 2009 Jun;64(6):636-45.
71. Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, et al. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005 Jul 26;102(30):10604-9.
72. Fraga MF, Esteller M. Epigenetics and aging: the targets and the marks. *Trends Genet*. 2007 Aug;23(8):413-8.
73. Bollati V, Schwartz J, Wright R, Litonjua A, Tarantini L, Suh H, et al. Decline in genomic DNA methylation through aging in a cohort of elderly subjects. *Mechanisms of ageing and development*. 2009 Apr;130(4):234-9.
74. Christensen BC, Houseman EA, Marsit CJ, Zheng S, Wrensch MR, Wiemels JL, et al. Aging and environmental exposures alter tissue-specific DNA methylation dependent upon CpG island context. *PLoS genetics*. 2009 Aug;5(8):e1000602.
75. Scarpa S, Cavallaro RA, D'Anselmi F, Fusco A. Gene silencing through methylation: an epigenetic intervention on Alzheimer disease. *J Alzheimers Dis*. 2006 Aug;9(4):407-14.
76. West RL, Lee JM, Maroun LE. Hypomethylation of the amyloid precursor protein gene in the brain of an Alzheimer's disease patient. *J Mol Neurosci*. 1995;6(2):141-6.
77. Wang SC, Oelze B, Schumacher A. Age-specific epigenetic drift in late-onset Alzheimer's disease. *PLoS one*. 2008;3(7):e2698.
78. Mastroeni D, Grover A, Delvaux E, Whiteside C, Coleman PD, Rogers J. Epigenetic changes in Alzheimer's disease: decrements in DNA methylation. *Neurobiology of aging*. 2011 Dec;31(12):2025-37.
79. Silva PN, Giguek CO, Leal MF, Bertolucci PH, de Labio RW, Payao SL, et al. Promoter methylation analysis of SIRT3, SMARCA5, HTERT and CDH1 genes in aging and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2008 Mar;13(2):173-6.
80. Mulder C, Schoonenboom NS, Jansen EE, Verhoeven NM, van Kamp GJ, Jakobs C, et al. The transmethylation cycle in the brain of Alzheimer patients. *Neuroscience letters*. 2005 Sep 30;386(2):69-71.
81. Fusco A, Nicolai V, Cavallaro RA, Ricceri L, D'Anselmi F, Coluccia P, et al. B-vitamin deprivation induces hyperhomocysteinemia and brain S-adenosylhomocysteine, depletes brain S-adenosylmethionine, and enhances PS1 and BACE expression and amyloid-beta deposition in mice. *Mol Cell Neurosci*. 2008 Apr;37(4):731-46.
82. Linnebank M, Popp J, Smulders Y, Smith D, Semmler A, Farkas M, et al. S-adenosylmethionine is decreased in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Neuro-degenerative diseases*. 2010;7(6):373-8.
83. Van Dam F, Van Gool WA. Hyperhomocysteinemia and Alzheimer's disease: A systematic review. *Archives of gerontology and geriatrics*. 2009 May-Jun;48(3):425-30.

84. Ladd-Acosta C, Pevsner J, Sabunciyan S, Yolken RH, Webster MJ, Dinkins T, et al. DNA methylation signatures within the human brain. *American journal of human genetics*. 2007 Dec;81(6):1304-15.
85. Choi SH, Worswick S, Byun HM, Shear T, Soussa JC, Wolff EM, et al. Changes in DNA methylation of tandem DNA repeats are different from interspersed repeats in cancer. *International journal of cancer*. 2009 Aug 1;125(3):723-9.
86. Esteller M. Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2005;45:629-56.
87. Hamm CA, Costa FF. The impact of epigenomics on future drug design and new therapies. *Drug discovery today*. 2011 Jul;16(13-14):626-35.
88. Yang X, Lay F, Han H, Jones PA. Targeting DNA methylation for epigenetic therapy. *Trends in pharmacological sciences*. 2010 Nov;31(11):536-46.
89. Payao SL, Smith MD, Bertolucci PH. Differential chromosome sensitivity to 5-azacytidine in Alzheimer's disease. *Gerontology*. 1998;44(5):267-71.
90. Scarpa S, Fuso A, D'Anselmi F, Cavallaro RA. Presenilin 1 gene silencing by S-adenosylmethionine: a treatment for Alzheimer disease? *FEBS letters*. 2003 Apr 24;541(1-3):145-8.
91. Papassotiropoulos A, Fountoulakis M, Dunckley T, Stephan DA, Reiman EM. Genetics, transcriptomics, and proteomics of Alzheimer's disease. *The Journal of clinical psychiatry*. 2006 Apr;67(4):652-70.
92. Zhao X, Tang R, Xiao Z, Shi Y, Feng G, Gu N, et al. An investigation of the dihydropyrimidinase-like 2 (DPYSL2) gene in schizophrenia: genetic association study and expression analysis. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)*. 2006 Dec;9(6):705-12.
93. Kitamura K, Takayama M, Hamajima N, Nakanishi M, Sasaki M, Endo Y, et al. Characterization of the human dihydropyrimidinase-related protein 2 (DRP-2) gene. *DNA Res*. 1999 Oct 29;6(5):291-7.
94. Koide T, Aleksic B, Ito Y, Usui H, Yoshimi A, Inada T, et al. A two-stage case-control association study of the dihydropyrimidinase-like 2 gene (DPYSL2) with schizophrenia in Japanese subjects. *Journal of human genetics*. 2010 Jul;55(7):469-72.
95. Edgar PF, Douglas JE, Cooper GJ, Dean B, Kydd R, Faull RL. Comparative proteome analysis of the hippocampus implicates chromosome 6q in schizophrenia. *Molecular psychiatry*. 2000 Jan;5(1):85-90.
96. Johnston-Wilson NL, Sims CD, Hofmann JP, Anderson L, Shore AD, Torrey EF, et al. Disease-specific alterations in frontal cortex brain proteins in schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. *The Stanley Neuropathology Consortium*. *Molecular psychiatry*. 2000 Mar;5(2):142-9.
97. Lubec G, Nonaka M, Krapfenbauer K, Gratzner M, Cairns N, Fountoulakis M. Expression of the dihydropyrimidinase related protein 2 (DRP-2) in Down syndrome and Alzheimer's disease brain is downregulated at the mRNA and dysregulated at the protein level. *Journal of neural transmission*. 1999;57:161-77.
98. Sultana R, Perluigi M, Butterfield DA. Redox proteomics identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain and in vivo and in vitro models of AD centered around Aβ(1-42). *Journal of chromatography*. 2006 Mar 20;833(1):3-11.

99. Yoshida H, Watanabe A, Ihara Y. Collapsin response mediator protein-2 is associated with neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *The Journal of biological chemistry*. 1998 Apr 17;273(16):9761-8.
100. Roher AE, Weiss N, Kokjohn TA, Kuo YM, Kalback W, Anthony J, et al. Increased A beta peptides and reduced cholesterol and myelin proteins characterize white matter degeneration in Alzheimer's disease. *Biochemistry*. 2002 Sep 17;41(37):11080-90.
101. Vlkolinsky R, Cairns N, Fountoulakis M, Lubec G. Decreased brain levels of 2',3'-cyclic nucleotide-3'-phosphodiesterase in Down syndrome and Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*. 2001 Jul-Aug;22(4):547-53.
102. Reinikainen KJ, Pitkanen A, Riekkinen PJ. 2',3'-cyclic nucleotide-3'-phosphodiesterase activity as an index of myelin in the post-mortem brains of patients with Alzheimer's disease. *Neuroscience letters*. 1989 Nov 20;106(1-2):229-32.
103. Almeida MB, do Nascimento JL, Herculano AM, Crespo-Lopez ME. Molecular chaperones: toward new therapeutic tools. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2011 Jul;65(4):239-43.
104. Rousaki A, Miyata Y, Jinwal UK, Dickey CA, Gestwicki JE, Zuiderweg ER. Allosteric drugs: the interaction of antitumor compound MKT-077 with human Hsp70 chaperones. *Journal of molecular biology*. 2011 Aug 19;411(3):614-32.
105. Yoo BC, Kim SH, Cairns N, Fountoulakis M, Lubec G. Deranged expression of molecular chaperones in brains of patients with Alzheimer's disease. *Biochemical and biophysical research communications*. 2001 Jan 12;280(1):249-58.
106. Muchowski PJ, Wacker JL. Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones. *Nature reviews*. 2005 Jan;6(1):11-22.
107. Lee LC, Chen CM, Chen FL, Lin PY, Hsiao YC, Wang PR, et al. Altered expression of HSPA5, HSPA8 and PARK7 in spinocerebellar ataxia type 17 identified by 2-dimensional fluorescence difference in gel electrophoresis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2009 Feb;400(1-2):56-62.
108. Jinwal UK, Miyata Y, Koren J, 3rd, Jones JR, Trotter JH, Chang L, et al. Chemical manipulation of hsp70 ATPase activity regulates tau stability. *J Neurosci*. 2009 Sep 30;29(39):12079-88.
109. Dou F, Netzer WJ, Tanemura K, Li F, Hartl FU, Takashima A, et al. Chaperones increase association of tau protein with microtubules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003 Jan 21;100(2):721-6.
110. Liu Y, Liu W, Song XD, Zuo J. Effect of GRP75/mthsp70/PBP74/mortalin overexpression on intracellular ATP level, mitochondrial membrane potential and ROS accumulation following glucose deprivation in PC12 cells. *Molecular and cellular biochemistry*. 2005 Jan;268(1-2):45-51.
111. Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Denis-Larose C, Massie B. Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Molecular and cellular biology*. 1997 Sep;17(9):5317-27.
112. Ding W, Lin L, Chen B, Dai J. L1 elements, processed pseudogenes and retrogenes in mammalian genomes. *IUBMB life*. 2006 Dec;58(12):677-85.
113. Wu HC, Delgado-Cruzata L, Flom JD, Kappil M, Ferris JS, Liao Y, et al. Global methylation profiles in DNA from different blood cell types. *Epigenetics*. 2011 Jan;6(1):76-85.

114. Zhu ZZ, Hou L, Bollati V, Tarantini L, Marinelli B, Cantone L, et al. Predictors of global methylation levels in blood DNA of healthy subjects: a combined analysis. *International journal of epidemiology*. 2010 Sep 15.
115. Kaneda A, Tsukamoto T, Takamura-Enya T, Watanabe N, Kaminishi M, Sugimura T, et al. Frequent hypomethylation in multiple promoter CpG islands is associated with global hypomethylation, but not with frequent promoter hypermethylation. *Cancer science*. 2004 Jan;95(1):58-64.
116. Muotri AR, Marchetto MC, Coufal NG, Oefner R, Yeo G, Nakashima K, et al. L1 retrotransposition in neurons is modulated by MeCP2. *Nature*. 2010 Nov 18;468(7322):443-6.
117. Coufal NG, Garcia-Perez JL, Peng GE, Marchetto MC, Muotri AR, Mu Y, et al. Ataxia telangiectasia mutated (ATM) modulates long interspersed element-1 (L1) retrotransposition in human neural stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011 Dec 20;108(51):20382-7.
118. Asada K, Kotake Y, Asada R, Saunders D, Broyles RH, Towner RA, et al. LINE-1 hypomethylation in a choline-deficiency-induced liver cancer in rats: dependence on feeding period. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2006;2006(1):17142.
119. Ahn JB, Chung WB, Maeda O, Shin SJ, Kim HS, Chung HC, et al. DNA methylation predicts recurrence from resected stage III proximal colon cancer. *Cancer*. 2011 May 1;117(9):1847-54.
120. Bollati V, Galimberti D, Pergoli L, Dalla Valle E, Barretta F, Cortini F, et al. DNA methylation in repetitive elements and Alzheimer disease. *Brain Behav Immun*. 2011 Aug;25(6):1078-83.
121. Bertolucci P, Okamoto I, Brucki S, Siviero M, Neto JT, Ramos L. Applicability of the CERAD neuropsychological battery to Brazilian elderly. *Arquivos de neuro-psiquiatria*. 2001 Sep;59(3-A):532-6.
122. Katz S, Ford AB, Moskowitz RW, Jackson BA, Jaffe MW. Studies of Illness in the Aged. the Index of Adl: a Standardized Measure of Biological and Psychosocial Function. *Jama*. 1963 Sep 21;185:914-9.
123. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*. 1984 Jul;34(7):939-44.
124. Bustin SA, Mueller R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clin Sci (Lond)*. 2005 Oct;109(4):365-79.
125. Hixson JE, Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J Lipid Res*. 1990 Mar;31(3):545-8.
126. Ehrich M, Nelson MR, Stanssens P, Zabeau M, Liloglou T, Xinarianos G, et al. Quantitative high-throughput analysis of DNA methylation patterns by base-specific cleavage and mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005 Nov 1;102(44):15785-90.
127. Rouzaut A, Lopez-Moratalla N, de Miguel C. Differential gene expression in the activation and maturation of human monocytes. *Arch Biochem Biophys*. 2000 Feb 15;374(2):153-60.
128. Sauce D, Appay V. Altered thymic activity in early life: how does it affect the immune system in young adults? *Curr Opin Immunol*. 2011 Aug;23(4):543-8.

129. Cole AR, Noble W, van Aalten L, Plattner F, Meimaridou R, Hogan D, et al. Collapsin response mediator protein-2 hyperphosphorylation is an early event in Alzheimer's disease progression. *Journal of neurochemistry*. 2007 Nov;103(3):1132-44.
130. Bioinformatics Lab- Wilmer Institute JHU. Tissue-specific Gene Expression and Regulation (TiGER) <http://bioinfowilmerjhuedu/tiger/>. acesso em fevereiro de 2012.
131. Gutierrez-Fernandez A, Gonzalez-Pinto A, Vega P, Barbeito S, Matute C. Expression of oligodendrocyte and myelin genes is not altered in peripheral blood cells of patients with first-episode schizophrenia and bipolar disorder. *Bipolar Disord*. 2010 Feb;12(1):107-9.
132. Che R, Tang W, Zhang J, Wei Z, Zhang Z, Huang K, et al. No relationship between 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase and schizophrenia in the Chinese Han population: an expression study and meta-analysis. *BMC Med Genet*. 2009;10:31.
133. Peirce TR, Bray NJ, Williams NM, Norton N, Moskvina V, Preece A, et al. Convergent evidence for 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase as a possible susceptibility gene for schizophrenia. *Archives of general psychiatry*. 2006 Jan;63(1):18-24.
134. Abdul HM, Calabrese V, Calvani M, Butterfield DA. Acetyl-L-carnitine-induced up-regulation of heat shock proteins protects cortical neurons against amyloid-beta peptide 1-42-mediated oxidative stress and neurotoxicity: implications for Alzheimer's disease. *J Neurosci Res*. 2006 Aug 1;84(2):398-408.
135. Torres LL, Quaglio NB, de Souza GT, Garcia RT, Dati LM, Moreira WL, et al. Peripheral oxidative stress biomarkers in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2011;26(1):59-68.
136. Mandel S, Grunblatt E, Riederer P, Amarglio N, Jacob-Hirsch J, Rechavi G, et al. Gene expression profiling of sporadic Parkinson's disease substantia nigra pars compacta reveals impairment of ubiquitin-proteasome subunits, SKP1A, aldehyde dehydrogenase, and chaperone HSC-70. *Ann N Y Acad Sci*. 2005 Aug;1053:356-75.
137. Shi M, Jin J, Wang Y, Beyer RP, Kitsou E, Albin RL, et al. Mortalin: a protein associated with progression of Parkinson disease? *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2008 Feb;67(2):117-24.
138. Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang LH, Midgett RM, Kuo KC, McCune RA, et al. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res*. 1982 Apr 24;10(8):2709-21.
139. Uno M, Oba-Shinjo SM, Camargo AA, Moura RP, Aguiar PH, Cabrera HN, et al. Correlation of MGMT promoter methylation status with gene and protein expression levels in glioblastoma. *Clinics (Sao Paulo)*. 2011;66(10):1747-55.
140. Csoka AB, Szyf M. Epigenetic side-effects of common pharmaceuticals: a potential new field in medicine and pharmacology. *Med Hypotheses*. 2009 Nov;73(5):770-80.

ABSTRACT

Alzheimer's Disease (AD) is the most common type of dementia in elderly population. AD is a complex neurodegenerative disorder that shows many gene expressions and protein alterations. Thus, gene expression regulation process, such epigenetic regulation, has been investigated in AD. **AIM:** This study aimed to evaluate gene expression and epigenetic regulation of *DPYSL2*, *CNP*, *HSPA8* e *HSPA9* genes in AD and controls. Furthermore, we aimed to evaluate the methylation levels of *LINE1* in brain and peripheral blood of AD patients and controls. **METHODS:** mRNA quantification was performed using qRT-PCR, and methylation patterns were determined by mass spectrometry and pyrosequencing. We analyzed three post mortem brain regions (entorhinal and auditory cortices and hippocampus) of 10 AD patients and 10 healthy elderly as well as peripheral blood lymphocytes of 16 young, 23 elderly and 34 AD patients. **RESULTS:** In peripheral blood, *DPYSL2* and *CNP* genes were upregulated in young controls, and *HSPA8* and *HSPA9* were upregulated in AD patients. *DPYSL2*, *CNP*, *HSPA8* and *HSPA9* genes were downregulated in auditory cortex, entorhinal cortex and hippocampus of AD patients compared to elderly control group. Between the blood and brain tissues of AD patients and elderly controls, *DPYSL2* and *CNP* genes presented higher expression in blood, whilst the *HSPA8* and *HSPA9* chaperones were more expressed in brain tissue. **CONCLUSIONS:** *DPYSL2* and *CNP* upregulation in peripheral blood of young controls could be related to a higher proliferation of immune system and to the activation of those genes in pathways still unknown. The upregulation of chaperones in blood may be associated with a cellular response to oxidative stress. Differences in mRNA levels observed between blood and brain of AD patients and controls could be due to tissue-specific functions. The downregulation of all four genes in brain tissue of AD patients compared to controls could indicate a role for those genes in AD pathology, acting in neuronal death, extracellular signal modulation and protein accumulation. The higher methylation levels of *LINE1* sequences may be related to AD development; however, methylation of candidate genes promoters does not appear to be the mechanism regulating gene expression in AD patients and controls.

APÊNDICES

Apêndice 1: Avaliação do Supervisor estrangeiro referente ao período de doutorado Sanduíche

**Institute of
Psychiatry**

at The Maudsley

**Social, Genetic and
Developmental Psychiatry
Research Centre**
Director
Peter McGuffin

Box Number P081
De Crespigny Park
Denmark Hill
London SE5 8AF
Telephone +44 (0)20 7848 0598
Fax +44 (0)20 7848 0575

**KING'S
College
LONDON**

University of London

www.kcl.ac.uk

Dr Jonathan Mill
Institute of Psychiatry
King's College London

29th July 2011

Re: Patricia Natalia Oliveira Da Silva's visit to King's College London

This letter confirms that Patricia has worked with my group in the Epigenetics laboratory of the "Social, Genetic and Developmental Psychiatry Centre (SGDP)" at the Institute of Psychiatry of the Kings College in London, from February 15 to July 29 2011.

During this period she was trained in a range of cutting-edge epigenetic techniques and actively participated in several research projects. The methods that Patricia used during her visit included:

1. Extraction of human DNA from blood- and saliva samples
2. Sodium bisulfite treatment of DNA samples using the EZ-96 DNA Methylation Kit
3. Bisulfite-specific Polymerase Chain Reactions (PCR) and examination of PCR products using Agarose Gels
4. Analysis of quantitative DNA methylation using the Sequenom EpiTYPER platform
5. Luminometric-based assay for Global DNA Methylation -LUMA
6. Analysis of quantitative DNA methylation using Pyrosequencing
7. Analysis of the Global Methylation via the analysis of LINE1 elements

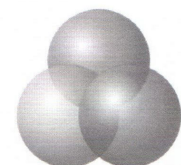
She was involved in a range of projects that are currently being executed in our laboratory, with a focus on the epigenetic analysis of psychiatric disorders. She was also able to conduct research on her own project "Epigenetic analysis in Alzheimer Disease and Aging". Everything was completed as scheduled, and Patricia is now able to analyze her data back in Brazil.

It was a pleasure having Patricia visit the lab. She was very hard-working and very personable. She is clearly an excellent student who will enjoy a very successful career in science. We are sorry to see her go!

Yours Sincerely



Dr Jonathan Mill
Senior Lecturer in Psychiatric Epigenetics
King's College London.



Social, Genetic and Developmental
Psychiatry Research Centre

Apêndice 2: Artigo publicado durante o doutorado

Journal of Alzheimer's Disease 13 (2008) 173–176
IOS Press

173

Short Communication

Promoter Methylation Analysis of *SIRT3*, *SMARCA5*, *HTERT* and *CDH1* Genes in Aging and Alzheimer's Disease

Patrícia Natália Oliveira Silva^a, Carolina Oliveira Gígeq^a, Mariana Ferreira Leal^a, Paulo Henrique Ferreira Bertolucci^b, Roger Willian de Labio^c, Spencer Luiz Marques Payão^c and Marília de Arruda Cardoso Smith^{a,*}

^aDepartment of Morphology, Genetics Division, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP/EPM), São Paulo, SP, Brazil

^bDepartment of Clinical Neurology, Neurology Division, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP/EPM), SP, Brazil

^cGenetics and Molecular Biology, Hemocentro, Faculdade de Medicina de Marília (FAMEMA), Marília, SP, Brazil

Communicated by Jesús Avila

Abstract. Longevity related genes were investigated concerning promoter methylation. *SIRT3*, *SMARCA5*, *HTERT* and *CDH1* promoters were analyzed in peripheral blood in relation to gender, age and Alzheimer's disease (AD). Methylation Specific PCR assay (MSP) was used. There were no significant differences in methylation frequencies of *SIRT3*, *SMARCA5* and *CDH1* among young, elderly and AD groups ($p > 0.05$), showing no association with aging or AD. On the other hand, *HTERT* methylation frequency was associated with the aging process, in that AD patients differed from elderly controls ($p = 0.0086$), probably due to telomere and immune dysfunctions involved in AD pathogenesis.

Keywords: Aging, Alzheimer's disease, *CDH1*, DNA methylation, epigenetics, *HTERT*, *SIRT3*, *SMARCA5*

INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative and progressive disease. AD is a complex disease classified as early familial onset and late sporadic onset. The cause of the sporadic form of the disease is unknown, probably because the disease is heterogeneous, caused by aging in concert with a complex interaction of both genetic and environmental risk factors [1].

Epigenetics is a gene expression regulation mechanism involved in many conditions. CpG islands in gene promoter regions are susceptible to this kind of regulation. DNA methylation is the most studied epigenetic alteration, occurring through the addition of a methyl radical to the cytosine base adjacent to guanine. Usually, when DNA is methylated in the gene promoter region, genes are inactivated and silenced [2]. Few studies have evaluated epigenetic alterations in AD [3].

The four genes associated with AD ($A\beta$ PP, PS1, PS2 and the APOE $\epsilon 4$ allele) described in the literature are not sufficient to explain all the cases of the disease. This study examined four genes chosen considering their role in longevity, apoptosis, silencing of ribosomal DNA genes (rDNA) and telomerase expression. The

*Corresponding author: Marília de Arruda Cardoso Smith, Disciplina de Genética, Departamento de Morfologia, Universidade Federal de São Paulo/ Escola Paulista de Medicina, Rua Botucatu 740 CEP: 04023-900, São Paulo, SP, Brazil. Tel.: +55 11 55764260; Fax: +55 11 55764264; E-mail: macsmith.morf@epm.br

Apêndice 3: Artigo publicado durante o período do Doutorado

Biomarkers, 2009; 14(8): 630–636informa
healthcare

ORIGINAL ARTICLE

hTERT methylation and expression in gastric cancerCarolina Oliveira Gígek¹, Mariana Ferreira Leal¹, Patrícia Natalia Oliveira Silva¹, Luara Carolina Frias Lisboa¹, Eleonidas Moura Lima², Danielle Queiroz Calcagno³, Paulo Pimentel Assumpção⁴, Rommel Rodriguez Burbano³, and Marília de Arruda Cardoso Smith¹¹*Disciplina de Genética, Departamento de Morfologia e Genética, Universidade Federal de São Paulo, SP, Brasil,*²*Departamento de Biologia, Campus Ministro Reys Velloso/Parnaíba, Universidade Federal do Piauí, PI, Brasil,*³*Laboratório de Citogenética Humana e Genética Toxicológica, Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, PA, Brasil, and* ⁴*Serviço de Cirurgia, Hospital Universitário João de Barros Barreto, Universidade Federal do Pará, PA, Brasil***Abstract**

Gastric cancer is the second most prevalent cause of cancer death worldwide. DNA methylation is a common event in gastric carcinogenesis. *hTERT* seems to be the rate-limiting determinant of telomerase activation, which is responsible for stability and life span. *hTERT* hypermethylation has been associated with telomerase expression. In the present study, we investigated the promoter methylation status and *hTERT* protein expression in gastric cancer and normal mucosa samples. One hundred and nine gastric cancer and 53 normal mucosa samples were investigated through methylation-specific PCR. Immunohistochemistry was analysed using peroxidase in 55 gastric cancer and 18 normal gastric mucosa samples. This is the first study evaluating *hTERT* methylation status in gastric carcinogenesis. We did not observe *hTERT* protein expression in normal gastric mucosa. Moreover, *hTERT* expression was observed in 80% of tumours and was associated with gastric cancer ($p < 0.0001$). Partial methylation was the most frequent pattern in gastric samples, even in normal mucosa. The frequency of specimens presenting hypermethylation was significantly higher in tumours than in normal mucosa samples ($p = 0.0002$), although the presence of hypermethylated promoter was not associated with a higher frequency of *hTERT* expression. A low correlation between *hTERT* protein expression and methylation was verified in gastric cancer samples. There was a clear difference in the frequency of *hTERT* expression and methylation within tumoral and non-tumoral tissues. Methylation status and telomerase expression may be useful for the diagnosis of gastric cancer and may have an impact on the anti-telomerase strategy for cancer therapy.

Keywords: Gastric cancer; *hTERT*; IHC; methylation; MSP; protein expression**Introduction**

Gastric cancer is the second most prevalent cause of cancer death worldwide (Li et al. 2008), and it is two to three times more frequent in developing countries. In the state of Pará, Northern Brazil, the gastric cancer mortality rates are higher than the national average rate (Resende et al. 2006).

Gastric cancer is the result of environmental, including diet and infectious agents, genetic and epigenetic factors (Shang & Pena 2005). Epigenetic events play a

key role in development and progression of cancer. DNA methylation is the most common epigenetic alteration and occurs by addition of a methyl radical on a deoxycytosine, frequently found in cytosine-phosphate-guanine (CpG) sites (Richardson 2003). Gene promoters are CpG-rich sites and contain transcriptional sites. Indeed, methylation of CpG islands is usually associated with gene silencing (Zinn et al. 2007). Moreover, gene promoter methylation is observed in carcinogenesis processes, including gastric cancer (Lima et al. 2007, 2008, Leal et al. 2007, Moura Lima et al. 2008, Guimaraes et al. 2007).

Address for Correspondence: Marília de Arruda Cardoso Smith, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Rua Botucatu 740, Ed. Lettão da Cunha, 04023-900, São Paulo - SP, Brazil. Tel: 55(11) 55764260. Fax: 55(11) 55764264. E-mail: macsmith.morf@epm.br

(Received 15 June 2009; revised 29 July 2009; accepted 01 August 2009)

ISSN 1354-750X print/ISSN 1366-5804 online © 2009 Informa UK Ltd
DOI: 10.3109/13547500903225912

<http://www.informahealthcare.com/bmk>

Apêndice 4: Artigo publicado durante o período do Doutorado.

Growth Hormone & IGF Research 20 (2010) 234–238



Contents lists available at ScienceDirect

Growth Hormone & IGF Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ghir

Insulin-like growth factor binding protein-3 gene methylation and protein expression in gastric adenocarcinoma

Carolina Oliveira Gigeck^a, Mariana Ferreira Leal^a, Luara Carolina Frias Lisboa^a,
 Patricia Natalia Oliveira Silva^a, Elizabeth Suchi Chen^a, Eleonidas Moura Lima^b, Danielle Queiroz Calcagno^c,
 Paulo Pimentel Assumpção^d, Rommel Rodriguez Burbano^c, Marilia de Arruda Cardoso Smith^{a,*}

^aDisciplina de Genética, Departamento de Morfologia e Genética, Universidade Federal de São Paulo, SP, Brazil

^bDepartamento de Biologia, Campus Ministro Reis Velloso/Parnaíba, Universidade Federal do Piauí, PI, Brazil

^cLaboratório de Citogenética Humana, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, PA, Brazil

^dServiço de Cirurgia, Hospital Universitário João de Barros Barreto, Universidade Federal do Pará, PA, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 September 2009

Revised 28 January 2010

Accepted 10 February 2010

Available online 9 March 2010

Keywords:

Gastric cancer

IGFBP-3

Methylation

Protein expression

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to evaluate *IGFBP-3* protein expression, its correlation with gene promoter methylation pattern in gastric carcinogenesis and with clinicopathological characteristics.

Design: Forty-three normal gastric mucosa and 94 adenocarcinoma samples were investigated through methylation specific PCR, after bisulfite modification. Immunohistochemistry was analyzed using peroxidase in 54 gastric cancer and 20 normal gastric mucosa samples.

Results: *IGFBP-3* expression was higher in tumor samples than in normal mucosa ($p < 0.0001$). Intestinal type presented a higher frequency of protein expression than diffuse type ($p = 0.0412$). Methylation frequency of *IGFBP-3* promoter in gastric samples revealed, respectively, 95.7% and 97.7% in neoplastic and non-neoplastic samples. The frequency of *IGFBP-3* methylation did not differ between tumor and normal samples (95.7% versus 97.7%, $p = 0.7810$). We did not observe a significant correlation between *IGFBP-3* promoter methylation and protein expression.

Conclusion: In summary, our study did not observe any influence of *IGFBP-3* promoter methylation on protein expression. Moreover we propose that *IGFBP-3* immunostaining in gastric tissue may be a useful marker for malignancy.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Insulin-like growth factors (IGF) modulate growth and development, and promote cellular proliferation, survival and differentiation [1]. IGF interaction with its receptors is modulated by the family of IGF binding proteins. Among this family, the most abundant binding protein in human serum is *IGFBP-3*, which circulates associated with IGF and a glycoprotein, called acid labile subunit [2]. *IGFBP-3* is also present in several tissues [3]. *IGFBP-3* inhibits IGF action by competitively binding IGFs that prevents their binding to the IGF receptor (IGF-R) [4]. Therefore, *IGFBP-3* is known to promote apoptosis and this fact suggests a protective against carcinogenesis [5]. While, *IGFBP-3* actions independent of IGF include the capacity to maintain growth stimulatory effects [6].

IGFBP-3 gene is located at 7p13 [7] and its transcription regulation is mediated by alterations in activity or properties of tran-

scriptional factor or by epigenetic modifications, such as DNA methylation or histone acetylation [8]. DNA methylation of CpG islands at *IGFBP-3* promoter has been described in renal, ovarian, liver, gastric, colorectal and breast cancer, and the expression of *IGFBP-3* protein appears to be inhibited by promoter methylation [9]. Furthermore, it is known that *IGFBP-3* expression is induced by the tumor suppressor p53 [5].

Tomii et al. [10] suggest that the role of *IGFBP-3* varies during carcinogenesis in different organs, and that inter-ethnic comparison of the methylation pattern of this gene has to be analyzed. It is well known that hypermethylation of the CpG island in tumor-related genes is one of the most important epigenetic alterations in cancer development. Thus, aberrant methylation could be used as diagnostic marker to identify cancer cells from normal samples and as a prognostic marker indicating tumor biological behavior [11].

Gastric cancer is still the second most prevalent cause of cancer death worldwide [12]. In the state of Pará, Northern Brazil, gastric cancer mortality rates are higher than the national average rate [13].

* Corresponding author. Address: Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Rua Botucatu 740, Ed. Leitão da Cunha, 04023-900, São Paulo, SP, Brazil. Tel.: +55 (11) 55764260; fax: +55 (11) 55764264.

E-mail address: macsmith.morf@epm.br (M.A.C. Smith).

Apêndice 5: Artigo publicado durante o período do Doutorado.

Cancer Investigation, 29:162–166, 2011
 ISSN: 0735-7907 print / 1532-4192 online
 Copyright © Informa Healthcare USA, Inc.
 DOI: 10.3109/07357907.2010.543365

informa
 healthcare

ORIGINAL ARTICLE: CLINICAL TRANSLATIONAL THERAPEUTICS

SMARCA5 Methylation and Expression in Gastric Cancer

Carolina Oliveira Gigek,¹ Luara Carolina Frias Lisboa,¹ Mariana Ferreira Leal,¹ Patricia Natalia Oliveira Silva,¹ Eleonidas Moura Lima,² André Salim Khayat,³ Paulo Pimentel Assumpção,⁴ Rommel Rodriguez Burbano,³ and Marília de Arruda Cardoso Smith¹

Disciplina de Genética, Departamento de Morfologia e Genética, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil,¹ Departamento de Biologia, Campus Ministro Reis Velloso/Parnaíba, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brazil,² Laboratório de Citogenética Humana, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, PA, Brasil³ Serviço de Cirurgia, Hospital Universitário João de Barros Barreto,⁴ Universidade Federal do Pará, PA, Brasil⁴

Here, we first evaluated SMARCA5 expression and promoter DNA methylation in gastric carcinogenesis. Immunohistochemistry and methylation-specific PCR were analyzed in 19 and 48 normal mucosa and in 52 and 92 gastric cancer samples, respectively. We observed higher immunoreactivity of SMARCA5 in gastric cancer samples than in normal mucosa. Moreover, SMARCA5 promoter methylation was associated with the absence of protein expression. Our findings suggest that SMARCA5 has a potential role in proliferation and malignancy in gastric carcinogenesis.

Keywords: Epigenetic; DNA methylation; Protein expression; IHC; SMARCA5

INTRODUCTION

Gastric cancer is the fourth most prevalent cancer in the world. However, due to its poor prognosis, gastric cancer is the second most common cause of death from cancer (1). The early detection of gastric cancer is very important for a good prognosis.

SMARCA5 (SNF2H), the human homologue of *Drosophila* imitation switch gene (ISWI), is a member of the SWI/SNF chromatin remodeling family of proteins, which has helicase and ATPase activity (2). SMARCA5 mediates DNA accessibility by sliding the histone octamer and, thus, is important for gene expression, DNA replication, DNA repair, and the maintenance of higher order chromatin structure (2, 3).

Chromatin remodeling complexes use the energy of ATP hydrolysis to change nucleosomal positions, so that specific regions of the genome become accessible for interaction with regulating factors (4). These chromatin remodeling complexes have been shown to promote both transcriptional activation and repression (5, 6). Not surprisingly, these complexes have been associated with malignant transformation (7).

There is a 1 kb CpG island with CG content up to 60% in SMARCA5 promoter and exon 1 (8). This CpG island contains binding sites of methylation-sensitive transcription factors such as Sp1, Myb, CREB, AP1, and MZF1 (9). These data suggest that SMARCA5 expression may be regulated by DNA methylation. The mechanism of SMARCA5 regulation is still unknown. DNA methylation is the most common epigenetic alteration and occurs by addition of a methyl radical on a deoxycytosine, frequently found in CpG sites. DNA methylation is usually associated with gene silencing (10).

The aim of this study was to investigate the protein expression and methylation pattern of SMARCA5 in gastric carcinogenesis and their correlation with clinicopathological characteristics.

METHODS

Samples

SMARCA5 protein expression was evaluated in 52 formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples of patients with sporadic gastric adenocarcinoma, in which 19 samples also had adjacent nonneoplastic and noninfiltrated gastric mucosa. Among these samples, the mean age was 56 ± 6.9 years and 70.4% were male.

SMARCA5 methylation pattern was evaluated in 48 were nonneoplastic gastric mucosa of patients (distant location of primary tumor) and in 92 sporadic gastric adenocarcinoma. In the studied samples, the mean age was 55 ± 10.35 years and 68.6% were male. SMARCA5 methylation and protein expression were both evaluated in 47 gastric cancer and 16 normal gastric mucosa samples.

All samples were classified according to Lauren (11) and tumors were staged using standard criteria by TNM staging (12). Table 1 shows the clinicopathological characteristics of the studied samples.

All gastric samples were obtained surgically in Pará State João de Barros Barreto University Hospital (HUIBB).

Correspondence to: Marília de Arruda Cardoso Smith, Professor of Genetics, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Rua Botucatu 740, Ed. Leitão da Cunha, 04023-900 São Paulo, SP, Brazil. email: macsmith.morf@epm.br

Cancer Investigation

Apêndice 6: Artigo submetido para *Alzheimer's and Dementia*.

Elsevier Editorial System(tm) for Alzheimer's & Dementia
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: SNAP25 expression profile in brain of Alzheimer's Disease and healthy elderly subjects

Article Type: Research Article

Keywords: Alzheimer's Disease; peripheral blood lymphocytes; post mortem brain tissue; qRT-PCR; SNAP25 expression; synaptic impairment.

Corresponding Author: Ms Tatiane Katsue Furuya,

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)

First Author: Tatiane K Furuya

Order of Authors: Tatiane K Furuya; Patrícia N Silva ; Spencer L Payão ; Paulo H Bertolucci ; Lucas Rasmussen ; Roger de Labio ; Ianna L Braga ; Elizabeth S Chen ; Gustavo Turecki ; Naguib Mechawar ; Marília A Smith

Abstract: Background: Alzheimer's Disease (AD) is the most common cause of dementia in elderly people. The presynaptic terminal is an important site of pathological changes in this disease, leading to synaptic loss in specific brain regions, such as in the cortex and hippocampus. We aimed to investigate SNAP25 (synaptosomal-associated protein, 25kDa) mRNA expression levels in peripheral blood lymphocytes of young and healthy elderly controls and AD patients as well as in post mortem brain regions (entorhinal and auditory cortices and hippocampus) of healthy elderly and AD subjects. Methods: mRNA quantification was performed by quantitative Reverse Transcription PCR, using the $\Delta\Delta CT$ method and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ formula to calculate the relative quantification. Results: A lack of SNAP25 expression was observed in peripheral blood lymphocytes. In brain tissue of the healthy elderly group, SNAP25 mRNA showed lower expression in the entorhinal cortex and hippocampus in comparison to the auditory cortex. Regarding the AD patients, we did not detect differences in SNAP25 expression among the analyzed brain regions. Furthermore, we showed significant decrease in SNAP25 expression in the three brain regions of AD patients in comparison to the healthy elderly group. Conclusion: Our study suggested that SNAP25 might be involved in specific transmitter pathway in the healthy elderly brain. Furthermore, the decreased SNAP25 RNA expression in all the brain regions of AD patient might suggest impairment of the synaptic function related to this disease. Moreover, we showed that the auditory cortex was as much affected as the hippocampus and the entorhinal cortex, the primary areas affected in this disorder.

Apêndice 7: Artigo submetido para *Geriatrics and Gerontology International*.

Geriatrics and Gerontology International



SIRT1, IGFBP-3 and CAV1 promoter DNA methylation in normal aging process

Journal:	<i>Geriatrics and Gerontology International</i>
Manuscript ID:	GGI-0038-2012
Manuscript Type:	Methodological Report
Date Submitted by the Author:	01-Feb-2012
Complete List of Authors:	Giquek, Carolina; Universidade Federal de São Paulo, Morphology and Genetics Lisboa, Luara; Universidade Federal de São Paulo, Morphology and Genetics Silva, Patricia; Universidade Federal de São Paulo, Morphology and Genetics Leal, Mariana; UNIFESP, Payão, Spencer; FAMEMA, Smith, Marília; Universidade Federal de São Paulo, Morphology and Genetics
Keywords:	
Optional Keywords:	

SCHOLARONE™
Manuscripts

GGI Editorial office (Email: ggi@blackwellpublishingasia.com)

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

Rother ET, Braga MER. Como elaborar sua tese: estrutura e referências. São Paulo: Projeto Gráfico e Editoração Eletrônica Amélia Oraci Gasparini; 2001.

Field, Andy. Descobrimo a estatística usando o SPSS. 2ª Edição. Porto Alegre: Editora Artmed; 2009.