



Diminuição da expressão dos genes *APP* e *CP* em doentes de Alzheimer sugere alteração da exportação de ferro celular nesta demência

Decrease in APP and CP mRNA expression in Alzheimer's disease patients suggests impairment of cellular iron export in this dementia

Cláudia Guerreiro¹, Bruno Silva², Ângela C. Crespo^{1,3}, Liliana Marques^{1,4}, Sónia Costa⁵, Ângela Timóteo⁵, Erica Marcelino⁶, Carolina Maruta⁶, Arminda Vilares¹, Mafalda Matos⁶, Frederico Simões Couto⁶, Paula Faustino², Ana Verdelho⁶, Manuela Guerreiro⁶, Ana Herrero⁵, Cristina Costa⁵, Alexandre de Mendonça⁶, Madalena Martins^{3,6}, Luciana Costa^{1,4}

luciana.costa@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis; (2) Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(3) Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras, Portugal

(4) Center for Biodiversity, Functional and Integrative Genomics, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

(5) Departamento de Neurologia, Hospital Prof. Dr. Fernando Fonseca, E.P.E., Amadora, Portugal

(6) Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

_Resumo

Recentemente tem-se assistido a um acumular de evidência sugerindo a implicação de uma desregulação do metabolismo do ferro (Fe) na fisiopatologia da doença de Alzheimer (DA). Neste trabalho, pretendemos esclarecer melhor os mecanismos moleculares subjacentes à homeostasia deste metal na DA, particularmente ao nível do efluxo celular. Assim, mediu-se em células mononucleares do sangue periférico de 73 doentes com DA e 74 controlos a expressão de genes diretamente envolvidos na regulação e exportação celular de Fe, utilizando a técnica de PCR quantitativo. Os resultados mostraram uma diminuição significativa na expressão dos genes aconitase (*ACO1*; $P=0,007$); ceruloplasmina (*CP*; $P<0,001$) e proteína precursora de beta amiloide (*APP*; $P=0,006$) em doentes com DA comparativamente com os voluntários saudáveis. Estas observações apontam para uma diminuição significativa da expressão dos genes associados com a exportação de Fe celular mediada pela ferroportina na DA. Assim, o presente estudo reforça resultados anteriores que mostram alterações no metabolismo do Fe e podem estar na origem da retenção intracelular deste metal e aumento de stress oxidativo característicos desta patologia.

_Abstract

A dysregulation of iron (Fe) metabolism in Alzheimer's disease (AD) has been suggested previously. Herein, we intended to further clarify the molecular mechanisms underlying Fe homeostasis in AD particularly at the level of cellular iron efflux. Thus, the expression of specific Fe metabolism-related genes directly involved in Fe regulation and export was assessed by quantitative PCR in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from 73 AD patients and 74 controls. A significant decrease in the expression of aconitase 1 (*ACO1*; $P=0.007$); ceruloplasmin (*CP*; $P<0.001$) and amyloid peptide precursor (*APP*; $P=0.006$) genes was found in AD patients compared with healthy volunteers. These observations point out to a significant downregulation of the expression of genes associated with ferroportin-mediated cellular Fe export in PBMCs from AD patients. The present findings support previous studies suggesting impairment of Fe homeostasis in AD, which may lead to cellular Fe retention and oxidative stress, a typical feature of this disease.

_Introdução e objetivo

A Doença de Alzheimer (DA) é a doença neurodegenerativa mais comum e uma das formas mais predominantes de demência em todo o mundo (1).

Os eventos patológicos iniciais no desenvolvimento da DA parecem estar associados à formação de formas diméricas e oligoméricas de peptídeos β amilóides ($A\beta$), que são formadas por clivagem específica na proteína precursora de beta amiloide (*APP*) (2) e se acumulam no cérebro. Embora os mecanismos subjacentes ao processo de deposição de $A\beta$ sejam ainda pouco compreendidos, várias linhas de evidência indicam que o ferro (Fe) através da mediação da formação de radicais oxidativos, pode estar intimamente implicado neste processo (3). Estudos anteriores mostraram que a *APP* é capaz de facilitar o efluxo de Fe celular através da interação com ferroportina (FPN), o único exportador de Fe conhecido até ao momento em mamíferos (4). Além disso, a *APP* apresenta várias semelhanças com outras ferroxidasas, como a ceruloplasmina (Cp) (5), nomeadamente na capacidade de interação com a FPN a exportar Fe mas também a nível da regulação da sua expressão através de citocinas pró-inflamatórias (6) sugerindo uma estreita associação entre DA, metabolismo Fe e resposta imune.

Estudos anteriores sugerem que algumas variantes genéticas em diversos genes relacionados com o metabolismo de Fe representam fatores de risco para a DA. Recentemente, o trabalho desenvolvido pelo presente grupo de investigação mostrou a

existência de associações significativas entre esta doença e SNPs encontrados em vários genes como o *TF*, receptor da *TF2 (TFR2)*, aconitase 1 (*ACO1*) e a *FPN (SLC40A1)*, apoiando o envolvimento de vias específicas do metabolismo do Fe na fisiopatologia da DA (7).

Neste contexto e a fim de melhor esclarecer a desregulação sistémica da homeostase do Fe na DA, propusemo-nos investigar mais profundamente nestes doentes a expressão de genes específicos do metabolismo do Fe, particularmente os relacionados com o efluxo celular deste metal.

_Materiais e métodos

População do estudo

Um total de 73 doentes com DA e 74 indivíduos caucasianos saudáveis foram incluídos neste trabalho. O diagnóstico de DA foi realizado de acordo com as diretrizes do *National Institute of Neurological Disorders and Stroke and Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA)* (8). O estudo foi aprovado pelas Comissões de Ética das instituições envolvidas e todos os participantes ou seus representantes legais assinaram um termo de consentimento informado, de acordo com a Declaração de Helsínki.

Análises bioquímicas e de expressão génica

Amostras de sangue total de todos os participantes no estudo foram tratadas para isolamento de soro e células mononucleares de sangue periférico (PBMCs), para posterior análise. Para as determinações bioquímicas, realizou-se a medição da concentração da Cp utilizando o método imunonefelométrico (Beckman Coulter, Brea, CA, EUA). A medição da atividade oxidásica da Cp (CPO) foi avaliada utilizando um ensaio colorimétrico manual, seguindo um protocolo adaptado (9).

Para o estudo de expressão génica, extraiu-se ARN total das PBMCs utilizando o kit *miRNeasy Mini* (Qiagen). A quantificação da expressão dos genes alvo foi realizada por PCR quantitativo num *ViiA™ 7 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Warrington, UK). O desenho dos *primers* utilizados para a amplificação dos fragmentos específicos dos

genes *HPRT1*, *FURIN*, *FTH*, *FTL*, *ACO1*, *TF*, *HMOX1*, *NRF2*, *APP* e *CP*, realizou-se através do uso do *software* ABI Primer Express (Applied Biosystems). A síntese da primeira cadeia de cDNA foi realizada usando 1 µg de ARN total, oligo (dT) 12-18 e a SuperScript® II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Pasadena, EUA). Cada amostra de cDNA foi diluída 5 vezes, 5 µl da diluição foi adicionado a 5 pmol de *primers* e SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) para um volume de reação final de 15 µl. Os parâmetros para a amplificação foram: 10' a 95°C, 40 ciclos de 15'' a 95°C e 30'' a 60°C. Quantificou-se a expressão génica com o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, utilizando o *HPRT1* como controle endógeno e um *pool* de ADNc como uma amostra de normalização.

O *software* PASW Statistics 18.0® (SPSS Inc.) foi utilizado para realizar a análise de variância univariada dos dados bioquímicos e de expressão génica, ajustados para idade e género (ANCOVA).

_Resultados

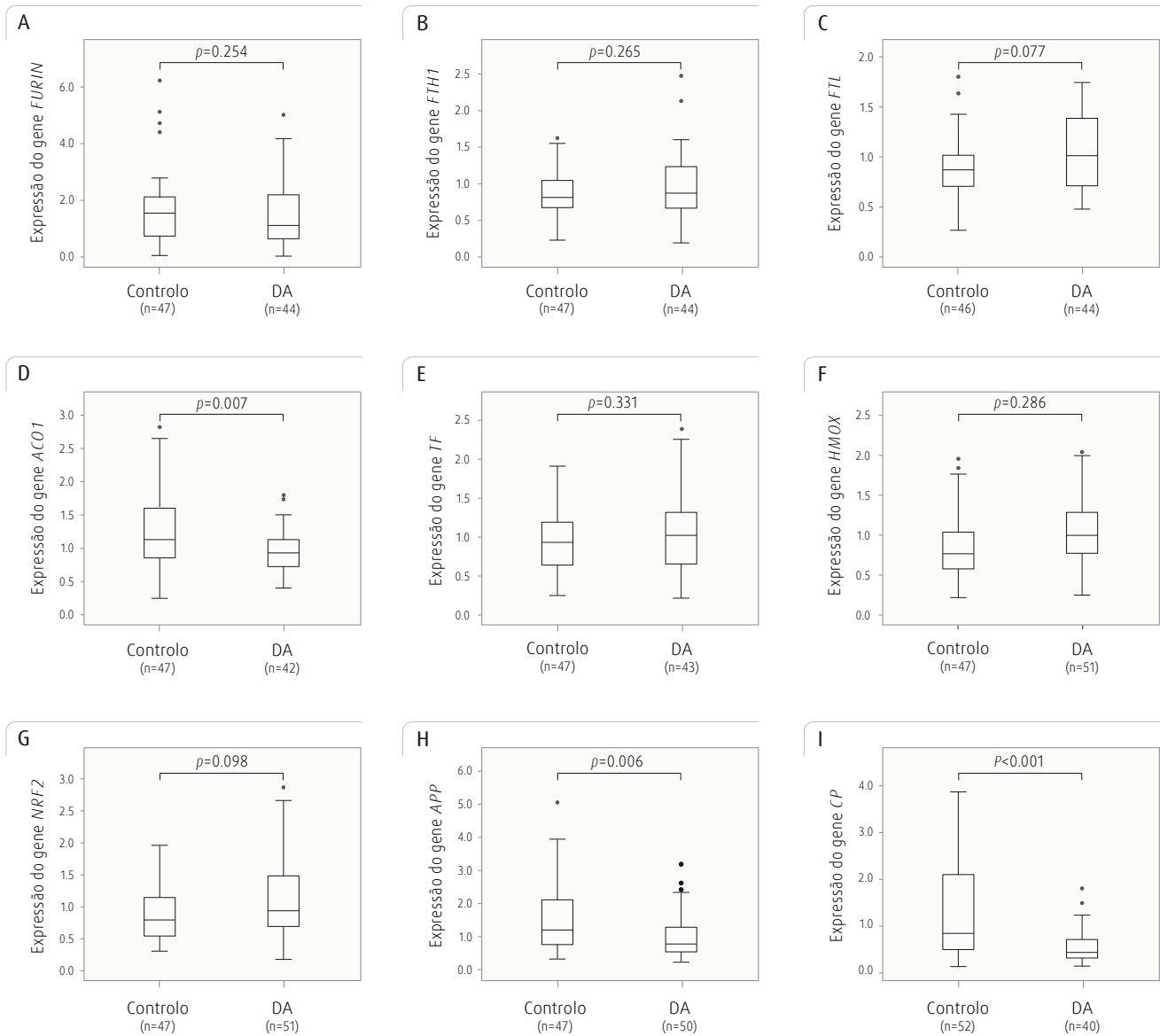
Os resultados obtidos a partir da análise qPCR mostraram uma diminuição significativa na expressão dos genes *ACO1* ($P=0,007$), *CP* ($P<0,001$) e *APP* ($P=0,006$) de doentes com DA em comparação com voluntários saudáveis (figura 1). Não foram observadas diferenças significativas entre estes dois grupos na expressão dos genes *FURIN*, *FTH*, *FTL*, *TF*, *HMOX1* e *NRF2*, nem na concentração de Cp no soro e sua atividade oxidásica (tabela 1).

_Discussão e conclusão

Neste trabalho, verificou-se uma diminuição significativa na expressão da *CP* e da *APP* em doentes com DA em comparação com voluntários saudáveis. Estudos anteriores indicam o envolvimento destas duas proteínas no efluxo celular de Fe através da interação com a *FPN* (5, 10) corroborando a nossa hipótese de que o comprometimento da exportação de Fe celular representa um mecanismo chave na patogénese da DA.

Por outro lado, a Cp é expressa quer como uma proteína solúvel segregada para o meio extracelular (CPs), ou como uma

Figura 1: Níveis de expressão de vários genes do metabolismo do ferro em doentes com DA em comparação com controlos.



A distribuição dos níveis de expressão (A) furina, (B) *FTH1*, (C) *FTL*, (D) *ACO1*, (E) *TF*, (F) *HMOX1*, (L) *NRF2*, (H) *APP* e (I) *CP* de doentes com DA e controlos é representada pelas *box-plots*. A quantificação foi efetuada através da normalização de cada amostra relativamente a um *pool* de indivíduos e usando o *HPRT1* como um gene *housekeeping*. Os pontos representam *outliers* moderados. O número de indivíduos analisados está indicado dentro de parêntesis. Utilizou-se a análise de variância univariada, ajustada para idade e género (ANCOVA) para comparar os níveis de expressão entre os dois grupos.

Tabela 1: Quantificação da ceruloplasmina (Cp) e da atividade oxidásica da ceruloplasmina (CPO) em soro de doentes de DA e indivíduos controlo.

Parâmetros	Casos de DA		Controlos		ANCOVA significância (F)
	n	média ± DP	n	média ± DP	
Cp (mg/dL)	67	37,37 ± 8,75	67	34,34 ± 8,76	0,307 (1,05)
CPO	70	121,68 ± 36,70	73	116,98 ± 37,04	0,923 (0,01)

proteína de membrana ancorada à superfície celular através de um motivo glicosilfosfatidilinositol (GPI) (11), constituindo esta última (GPI-Cp) a forma predominante de CP expressa no cérebro, onde desempenha um papel crucial na homeostase do Fe e na defesa antioxidante (12). Estudos anteriores mostram que a atividade ferroxidásica de ambas as isoformas da CP é crucial para a exportação de Fe mediada pela FPN. Neste trabalho, medimos a concentração da CPs bem como a sua atividade oxidásica no soro, mas não foram encontradas diferenças significativas entre doentes com DA e controlos. No entanto, não se pode descartar a hipótese da atividade oxidásica da CP estar alterada no cérebro dos doentes estudados. Além disso, estes resultados sugerem que a diminuição na expressão do ARNm total da CP encontrados em PBMCs de doentes com DA poderia ser atribuída a uma diminuição nos níveis de ARNm da GPI-Cp, em vez de uma diminuição da expressão de CPs.

Adicionalmente, neste estudo observou-se também uma diminuição da expressão da *ACO1* (ou *IRP1*) em PBMCs de doentes com DA, quando comparados com os controlos. Visto a *IRP1* ser uma proteína-chave no principal sistema de regulação celular pós-transcricional do metabolismo do ferro (*IRP/IRE*), pode-se especular sobre o impacto que a alteração da sua expressão pode ter nos mecanismos subjacentes à manutenção da homeostasia do Fe celular. De facto, alguns estudos demonstraram que os *IRP* estão implicados na regulação do Fe no cérebro. Por exemplo, os níveis de *APP* são modulados por *IRP1* (13) aumentando a sua expressão no hipocampo de ratos *IRESB2-/-* (14). Além disso, também foi demonstrado que a regulação negativa da expressão de *ACO1* é induzida pela hipóxia (15). Curiosamente, um número substancial de evidências mostra a hipóxia como um importante fator ambiental que pode contribuir para a patogénese da DA (16). Assim, muito embora se desconheça os mecanismos pelos quais a diminuição de expressão *IRP1* em PBMC de doentes com DA tem um efeito na desregulação da homeostase do Fe, não se poderá subestimar o seu putativo impacto fisiológico neste contexto.

Em resumo, os dados obtidos neste estudo integram várias linhas de evidência que sugerem o comprometimento do efluxo de Fe celular na fisiopatologia da DA. Estes resultados obtidos com base numa estratégia de integração de dados genéticos e fenotípicos pode ser crucial para fornecer novas pistas para o desenvolvimento de novas formas de tratamento e diagnóstico desta patologia.

Referências bibliográficas:

- (1) Wortmann M. Dementia: a global health priority - highlights from an ADI and World Health Organization report. *Alzheimers Res Ther.* 2012;4(5):40. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3580397/
- (2) Walsh DM, Selkoe DJ. A beta oligomers - a decade of discovery. *J Neurochem.* 2007;101(5):1172-84. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1471-4159.2006.04426.x/full>
- (3) Duce JA, Bush AI. Biological metals and Alzheimer's disease: implications for therapeutics and diagnostics. *Prog Neurobiol.* 2010;92(1):1-18.
- (4) Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, et al. Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature.* 2000;403(6771):776-81.
- (5) Duce JA, Tsatsanis A, Cater MA, et al. Iron-export ferroxidase activity of β -amyloid precursor protein is inhibited by zinc in Alzheimer's disease. *Cell.* 2010;142(6):857-67. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2943017/
- (6) Rogers JT, Leiter LM, McPhee J, et al. Translation of the alzheimer amyloid precursor protein mRNA is up-regulated by interleukin-1 through 5'-untranslated region sequences. *J Biol Chem.* 1999;274(10):6421-31. www.jbc.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=10037734
- (7) Crespo AC, Silva B, Marques L, et al. Genetic and biochemical markers in patients with Alzheimer's disease support a concerted systemic iron homeostasis dysregulation. *Neurobiol Aging.* 2014;35(4):777-85. Epub 2013 Oct 17.
- (8) McKhann G, Drachman D, Folstein M, et al. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology.* 1984;34(7):939-44.
- (9) Schosinsky KH, Lehmann HP, Beeler MF. Measurement of ceruloplasmin from its oxidase activity in serum by use of o-dianisidine dihydrochloride. *Clin Chem.* 1974;20(12):1556-63.
- (10) Marques L, Auriac A, Willemetz A, et al. Immune cells and hepatocytes express glycosylphosphatidylinositol-anchored ceruloplasmin at their cell surface. *Blood Cells Mol Dis.* 2012;48(2):110-20. Epub 2011 Dec 16.
- (11) Hellman NE, Gitlin JD. Ceruloplasmin metabolism and function. *Annu Rev Nutr.* 2002;22:439-58. Epub 2002 Apr 4.
- (12) Patel BN, Dunn RJ, Jeong SY, et al. Ceruloplasmin regulates iron levels in the CNS and prevents free radical injury. *J Neurosci.* 2002;22(15):6578-86. www.jneurosci.org/content/22/15/6578.long
- (13) Cho HH, Cahill CM, Vanderburg CR, et al. Selective translational control of the Alzheimer amyloid precursor protein transcript by iron regulatory protein-1. *J Biol Chem.* 2010;285(41):31217-32. www.jbc.org/content/285/41/31217.long
- (14) Mueller C, Magaki S, Schrag M, et al. Iron regulatory protein 2 is involved in brain copper homeostasis. *J Alzheimers Dis.* 2009;18(1):201-10. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC19584448/
- (15) Luo QQ, Wang D, Yu MY, et al. Effect of hypoxia on the expression of iron regulatory proteins 1 and the mechanisms involved. *IUBMB Life.* 2011;63(2):120-8. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/iub.419/full>
- (16) Daulatzai MA. Death by a thousand cuts in Alzheimer's disease: hypoxia--the prodrome. *Neurotox Res.* 2013;24(2):216-43.