

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
ANAÍTI ANTUNES DOS SANTOS

ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DO GENE *MME*, A
DOENÇA DE ALZHEIMER E A ATIVIDADE DA BUTIRILCOLINESTERASE

CURITIBA
2015

ANAÍTI ANTUNES DOS SANTOS

ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DO GENE *MME*, A
DOENÇA DE ALZHEIMER E A ATIVIDADE DA BUTIRILCOLINESTERASE

Trabalho entregue como requisito parcial à
obtenção do grau de bacharel em
Biomedicina pela Universidade Federal do
Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Lehtonen
Rodrigues de Souza

CURITIBA

2015

RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa que afeta predominantemente indivíduos com mais de 65 anos de idade, apesar de existirem formas de início precoce. Fisiopatologicamente, a DA é caracterizada por acúmulo do peptídeo β -amilóide entre os neurônios e emaranhados intraneuronais da proteína tau associada aos microtúbulos. Como consequência, ocorre morte de neurônios de vias colinérgicas relacionadas às funções cognitivas, causando declínio progressivo. A DA tem causas multifatoriais, assim, fatores de risco genéticos interagem com fatores de risco ambientais podendo levar ao desenvolvimento da doença, cuja principal manifestação é o comprometimento da memória. Quanto aos fatores de risco genéticos, alguns alelos já estão estabelecidos, porém as causas genéticas da doença não estão completamente elucidadas. O presente estudo verificou associação entre polimorfismos do gene *MME*, cujo produto, a neprilisina, tem função reconhecida na degradação do peptídeo $A\beta$ no cérebro, e a doença de Alzheimer. Também foi investigada relação entre as variantes do *MME* e a atividade da enzima butirilcolinesterase (BChE), envolvida na hidrólise da acetilcolina. DNA genômico extraído do sangue de indivíduos com diagnóstico de doença de Alzheimer, de idosos cognitivamente saudáveis e de controle populacional foi genotipado para os SNPs rs13086740 (A/G), rs2016846 (T/G) e rs9849573 (A/G) do gene *MME* por meio de *TaqMan* em aparelho de PCR em tempo real. As frequências alélicas e genotípicas foram comparadas entre os grupos por meio do teste do qui-quadrado e foi verificada relação dos polimorfismos com os níveis de atividade da BChE através dos testes t e de Mann-Whitney. A comparação das frequências genotípicas para o rs2016846 entre casos e controle populacional foi significativa ($X^2 = 4,53$; $p = 0,033$) com diminuição na frequência do genótipo GG entre os casos, o que indica efeito protetivo do alelo G em homozigose contra a DA. É observada uma tendência à significância nas diferenças dos níveis de atividade da BChE entre genótipos do *MME* nos controles idosos e no controle populacional. A influência dos genótipos do *MME* na atividade da BChE talvez ocorra devido à proximidade entre os genes *MME* e *BCHE* no cromossomo 3 e envolvimento de mecanismos de regulação da expressão gênica relacionados entre eles, além de eventual interação funcional entre as proteínas neprilisina e BChE desconhecida até o momento.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer, estudo de associação, *MME*, butirilcolinesterase.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DO GENE <i>MME</i> E DOS 4 TRANSCRITOS DE MRNA GERADOS.....	7
FIGURA 2. ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA DA NEPRILISINA COMPLEXADA AO INIBIDOR PHOSPHORAMIDON.....	9
FIGURA 3. SÍTIOS DE CLIVAGEM DA NEPRILISINA NO PEPTÍDEO AB ₄₂	10
TABELA 1. DISTRIBUIÇÕES ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DOS SNPS DO GENE <i>MME</i> NAS AMOSTRAS E O RESULTADO DA COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ENTRE OS GRUPOS POR MEIO DO TESTE DO QUI-QUADRADO.....	18
TABELA 2. COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DE ATIVIDADE DA BCHE ENTRE OS GENÓTIPOS DOS TRÊS SNPS DO <i>MME</i> NO GRUPO ALZHEIMER.....	19
TABELA 3. COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DE ATIVIDADE DA BCHE ENTRE OS GENÓTIPOS DOS TRÊS SNPS DO <i>MME</i> NO CONTROLE IDOSO.....	20
TABELA 4. COMPARAÇÃO DAS MEDIANAS DA ATIVIDADE DA BCHE ENTRE OS GENÓTIPOS DOS TRÊS SNPS DO <i>MME</i> NO CONTROLE POPULACIONAL..	20

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO GERAL	3
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3. JUSTIFICATIVA	4
4. REVISÃO DA LITERATURA	5
4.1 DOENÇA DE ALZHEIMER	5
4.2 GENE <i>MME</i>	7
4.3 NEPRILISINA.....	8
4.4 NEPRILISINA E DOENÇA DE ALZHEIMER.....	9
4.5 POLIMORFISMOS NO GENE <i>MME</i> E DOENÇA DE ALZHEIMER	10
4.6 BUTIRILCOLINESTERASE E A DOENÇA DE ALZHEIMER	11
5. MATERIAIS E MÉTODOS	13
5.1 AMOSTRAS.....	13
5.2 EXTRAÇÃO DE DNA.....	14
5.3 GENOTIPAGEM POR <i>TaqMan</i>	14
5.4 ENSAIO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA	15
5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	16
6. RESULTADOS	17
6.1 ASSOCIAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS DO GENE <i>MME</i> E A DA	17
6.2 RELAÇÕES ENTRE GENÓTIPOS DO <i>MME</i> E A ATIVIDADE DA BUTIRILCOLINESTERASE PLASMÁTICA.....	19
7. DISCUSSÃO	211
8. CONCLUSÃO	233
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	244

1. INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) é uma demência insidiosa e progressiva que ocorre majoritariamente a partir dos 65 anos de idade. É caracterizada por declínio cognitivo global e acúmulo de depósitos da proteína β -amilóide ($A\beta$) e emaranhados neurofibrilares no cérebro (BRAAK & BRAAK, 1991). O acúmulo destas estruturas proteicas em determinadas regiões cerebrais causa morte neuronal principalmente de neurônios colinérgicos, relacionados às funções cognitivas (COYLE *et al.*, 1983; PERRY *et al.*, 1999).

A DA é multifatorial, sendo que suas causas não estão completamente elucidadas até o momento. Fatores ambientais e genéticos estão relacionados ao desenvolvimento da doença.

Na forma geneticamente complexa ou esporádica do Alzheimer o alelo $\epsilon 4$ do gene *APOE* é um fator de risco estabelecido (FARRER *et al.*, 1997). Além deste, através do avanço nas técnicas de identificação, variantes de outros genes têm sido associadas à demência, em especial genes de proteínas do sistema imunológico, do metabolismo de lipídeos e genes envolvidos no funcionamento sináptico (revisado em BETTENS *et al.*, 2013).

As formas mendelianas de início precoce da doença, que se manifestam antes dos 65 anos de idade, são associadas às mutações localizadas principalmente em três genes: *APP*, *PSEN1* e *PSEN2* (LEVY *et al.*, 1990; GOATE *et al.*, 1991; LEVY-LAHAD *et al.*, 1995; ROGAEV *et al.*, 1995; SHERRINGTON *et al.*, 1995).

O estudo e a elucidação dos fatores de risco genéticos para a DA trazem a possibilidade da aplicação dos conhecimentos no desenvolvimento de terapias e uso de marcadores genéticos para diagnóstico.

O gene *MME* localiza-se na posição 3q25.1-q25.2 e codifica a proteína neprilina, uma metaloendopeptidase de membrana do tipo II expressa em diversos tecidos, em especial nos rins e cérebro (ERDOS & SKIDGEL, 1988). A função da enzima relaciona-se à modulação dos níveis de diferentes peptídeos sinalizadores no organismo, entre eles substância P, encefalinas e peptídeo atrial natriurético (TURNER *et al.*, 2001). Sabe-se que esta endopeptidase também degrada grande

quantidade do peptídeo β -amilóide em regiões cerebrais vulneráveis à formação das placas senis (BARNES *et al.*, 1995; HOWELL *et al.*, 1995; IWATA *et al.*, 2000), que caracterizam a doença de Alzheimer.

Estudos genéticos associaram polimorfismos no gene *MME* com a doença de Alzheimer em algumas populações (CLARIMÓN *et al.*, 2003; HELISALMI *et al.*, 2004; SAKAI *et al.*, 2004; MINERS *et al.*, 2012).

A enzima butirilcolinesterase (BChE) hidrolisa ésteres de colina, incluindo a acetilcolina, neurotransmissor em déficit nos pacientes com DA devido à morte de neurônios colinérgicos resultante dos processos fisiopatológicos da doença (COYLE *et al.*, 1983). A acetilcolina é um neurotransmissor mediador de importantes funções cognitivas, entre elas, comportamento, atenção e memória, as quais estão em declínio na DA (COYLE *et al.*, 1983; PERRY *et al.*, 1999).

Maior atividade da BChE é vista no cérebro de pacientes com DA (PERRY *et al.*, 1978; CIRO *et al.*, 2012), enquanto que menor atividade da enzima é identificada no plasma de pacientes com DA em comparação com idosos cognitivamente saudáveis (BONO, 2014). Estas alterações na atividade enzimática são consequência da presença da doença de Alzheimer, que, ao longo da progressão, leva a mudanças nas concentrações da acetilcolinesterase (AChE) e de acetilcolina (BONO, 2014).

Além do papel na hidrólise da acetilcolina, a BChE tem funções não enzimáticas relacionadas à DA. A enzima é encontrada junto às placas senis e emaranhados neurofibrilares, indicando uma participação da proteína em vias relacionadas à estas estruturas (GÓMEZ-RAMOS & MORÁN, 1997; DIAMANT *et al.*, 2006; PODOLY *et al.*, 2009).

Tendo em vista o papel da neprilisina na degradação do peptídeo β -amilóide no cérebro, o presente trabalho investigou associação entre variantes do gene *MME* e a doença de Alzheimer. Também foi verificada influência destes polimorfismos na atividade da butirilcolinesterase, uma vez que estudo anterior do nosso laboratório demonstrou relação entre genótipos do *MME* e a atividade da BChE plasmática (SIMÃO-SILVA, 2014). Os genes *MME* e *BCHE* estão próximos no braço longo do cromossomo 3 (*MME*: 3q25.1-q25.2 e *BCHE*: 3q26.1-q26.2) e ambos são

associados à DA (CLARIMÓN *et al.*, 2003; PODOLY *et al.*, 2008; LANE *et al.*, 2009 MINERS *et al.*, 2012).

2. OBJETIVO GERAL

Verificar a existência de associação entre os polimorfismos rs13086740, rs2016846 e rs9849573 do gene *MME* e a doença de Alzheimer, assim como suas possíveis influências na atividade da enzima butirilcolinesterase plasmática.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Genotipar os SNPs do *MME* em amostras de DNA genômico de indivíduos diagnosticados com DA, idosos cognitivamente saudáveis, bem como em amostra representativa da população geral de Curitiba (controle populacional), com auxílio de sondas *TaqMan®*.
- Medir os níveis de atividade da enzima butirilcolinesterase plasmática através de ensaio de atividade enzimática baseado em espectrofotometria lida no aparelho *Tecan®*.
- Comparar as frequências alélicas e genótípicas entre os grupos a fim de verificar a existência de associação dos polimorfismos com a doença de Alzheimer.
- Avaliar se existe influência dos alelos ou genótipos do gene *MME* nos valores da atividade total da butirilcolinesterase plasmática.

3. JUSTIFICATIVA

Dada a importância da neprilisina no catabolismo do peptídeo β -amiloide no cérebro (BARNES *et al.*, 1995; HOWELL *et al.*, 1995; IWATA *et al.*, 2000) e o conhecimento de que alterações na proteína e variações no gene *MME* estão associados ao acúmulo de $A\beta$ e à DA (IWATA *et al.*, 2001; YASOGIMA *et al.*, 2001; SAKAI *et al.*, 2004; MINERS *et al.*, 2012), o presente trabalho investigou associação entre variantes do gene *MME* e a doença de Alzheimer.

Os polimorfismos aqui estudados, rs13086740 (A>G), rs2016846 (T>G) e rs9849573 (A>G), localizam-se em introns dentro de três dos quatro blocos haplotípicos distintos do gene *MME*. Portanto, estes SNPs cobrem boa parte do gene, estando em desequilíbrio de ligação com variantes exônicas e talvez influenciando a regulação da expressão do *MME*.

O estudo também verificou uma possível influência destes polimorfismos na atividade da butirilcolinesterase, uma vez que estudo anterior do nosso laboratório encontrou relação entre genótipos do *MME* e a atividade da BChE plasmática, considerando a proximidade entre os genes *MME* e *BCHE* no braço longo do cromossomo 3 (SIMÃO-SILVA, 2014). Sabe-se que a atividade da BChE é alterada na DA e o papel de variantes do gene *BCHE* associadas à estas mudanças no desenvolvimento da DA é divergente entre estudos. Logo, estas alterações poderiam ser reflexo do envolvimento de genes vizinhos na DA, entre eles o *MME*.

A associação citada anteriormente entre SNPs do *MME* e a atividade da BChE plasmática foi observada em idosos. Com o objetivo de caracterizar melhor esta relação, o presente estudo incluiu uma amostra representativa da população geral.

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1 DOENÇA DE ALZHEIMER

Demência é diagnosticada quando há comprometimento em dois ou mais domínios cognitivos (memória, funções executivas, habilidades visuais-espaciais, linguagem e personalidade ou comportamento) independente de memória. Não existe mais a obrigatoriedade do comprometimento da memória exigido pelo DSM IV, DSM-III-R e CID-10 (FROTA *et al.*, 2011).

A doença de Alzheimer (DA) é a demência mais prevalente entre idosos. Clinicamente, ela pode ser dividida em DA de início precoce (afeta indivíduos com menos de 65 anos de idade) e DA de início tardio (afeta indivíduos acima dos 65 anos de idade). Ambas são caracterizadas pela presença de placas do peptídeo β -amilóide e emaranhados intraneuronais da proteína associada aos microtúbulos tau (MAPT) hiperfosforilada (BRAAK & BRAAK, 1991). Como consequência do acúmulo destes agregados proteicos, ocorre morte de neurônios colinérgicos em regiões do cérebro, entre elas o hipocampo, envolvidas em processos cognitivos, como a memória (COYLE *et al.*, 1983).

Em relação ao curso clínico da doença, a DA tem início insidioso e de deterioração progressiva. O prejuízo de memória é o evento clínico de maior magnitude e o primeiro a ser observado. O quadro evolui gradualmente com prejuízo em outras funções cognitivas (GALLUCCI *et al.*, 2005). O diagnóstico se baseia na história clínica, em exames laboratoriais e de imagem, no exame neurológico e na avaliação neuropsicológica (CARAMELLI & BARBOSA, 2002).

Quanto às causas, a doença de Alzheimer é uma demência multifatorial e geneticamente complexa, na grande maioria dos casos. O estudo da DA de início precoce em famílias cuja doença é herdada de forma mendeliana auxiliou na compreensão não somente do Alzheimer monogênico, mas também dos mecanismos patofisiológicos gerais característicos da doença, que são basicamente os mesmos nas duas formas (BRAAK & BRAAK, 1991; DE STROOPER *et al.*, 1998; SLEEGERS *et al.*, 2006).

Os casos de início precoce representam 5% do total de casos da DA (revisado em ROCCHI *et al.*, 2003) e são associados às mutações em três genes principais: *APP*, *PSEN1* e *PSEN2* (LEVY *et al.*, 1990; GOATE *et al.*, 1991; LEVY-LAHAD *et al.*, 1995; ROGAEV *et al.*, 1995; SHERRINGTON *et al.*, 1995). As mutações encontradas no gene *APP* alteram o padrão de produção do peptídeo β -amilóide a partir da proteína precursora amiloide (APP), favorecendo a formação das chamadas placas senis entre os neurônios (SLEEGERS *et al.*, 2006; TOMIYAMA *et al.*, 2008; DI FEDE *et al.*, 2009). Mutações em *PSEN1* e *PSEN2* também afetam a produção do peptídeo amiloide, prejudicando a clivagem da proteína precursora amiloide pela enzima γ -secretase, o que leva a aumento do peptídeo nas placas senis (DE STROOPER *et al.*, 1998; BENTAHIR *et al.*, 2006; KUMAR-SINGH *et al.*, 2006). A descoberta destes três genes causais sugeriu o papel central do peptídeo β -amilóide na patogênese da Doença de Alzheimer.

A DA de início tardio é geneticamente complexa, resultando da interação entre múltiplos fatores de risco genéticos e ambientais. O primeiro gene fortemente associado à DA de início tardio foi o gene *APOE*, que codifica a apolipoproteína E (FARRER *et al.*, 1997). Indivíduos que possuem um alelo $\epsilon 4$ do gene *APOE* tem risco três vezes maior de desenvolver a DA, e aqueles com dois alelos $\epsilon 4$ tem risco quinze vezes maior de manifestar a doença em comparação com indivíduos que possuem o genótipo mais frequente *APOE* $\epsilon 3 \epsilon 3$ (FARRER *et al.*, 1997). Estudo mostrou que a ApoE é um dos componentes das placas amiloides cerebrais e que ela promove a fibrilogênese do peptídeo β -amilóide (CORDER *et al.*, 1998).

Com o avanço nas técnicas de sequenciamento, desde 2009 pelo menos nove novos *loci* de risco foram descobertos. Os genes identificados têm papel em vias de processamento de lipídeos (*APOE*, *CLU*, *ABCA7*), no sistema imune (*CLU*, *CR1*, *ABCA7*, *CD33*, *EPHA1*), em vias de transmissão sináptica (*PICALM*, *BIN1*, *CD33*, *CD2AP*), além de envolvimento com o metabolismo do peptídeo β -amilóide (*CLU*, *PICALM*, *BIN1*, *CD2AP*) e tau (*BIN1*) (revisado em BETTENS *et al.*, 2013).

4.2 GENE *MME*

O gene *MME* situa-se na posição 3q25.1-q25.2 e codifica a proteína neprilisina, uma metaloendopeptidase de membrana do tipo II expressa em diversos tecidos (revisado em CARSON & TURNER, 2002). O *MME* tem 80Kb e é composto por 24 exons. Os exons 1 e 2 fazem parte da sequência 5'UTR, o exon 3 codifica o códon de início da tradução e os domínios citoplasmático e transmembrana (D'ADAMIO *et al.*, 1989). Vinte exons curtos (4-23) codificam a porção extracelular da enzima e o exon 24 codifica os aminoácidos da porção C-terminal e contém a região 3'UTR (D'ADAMIO *et al.*, 1989). A sequência pentapeptídica His-Glu-Ile-Thr-His, associada à metaloendopeptidases que ligam zinco, e o sítio catalítico são codificados pelo exon 19 (D'ADAMIO *et al.*, 1989).

A regulação transcricional do *MME* ocorre de maneira tecido específica. O gene possui dois promotores alternativos e quatro diferentes transcritos de mRNA são gerados com variações na sequência à 5'UTR, uma vez que ocorre *splicing alternativo* entre os exons 1 e 3 (D'ADAMIO *et al.*, 1989; LI *et al.*, 1995; ISHIMARU & SHIPP, 1995). O transcrito do tipo 1, contendo uma repetição dinucleotídica polimórfica no promotor, é predominantemente expresso nos neurônios (IWATA *et al.*, 2005).

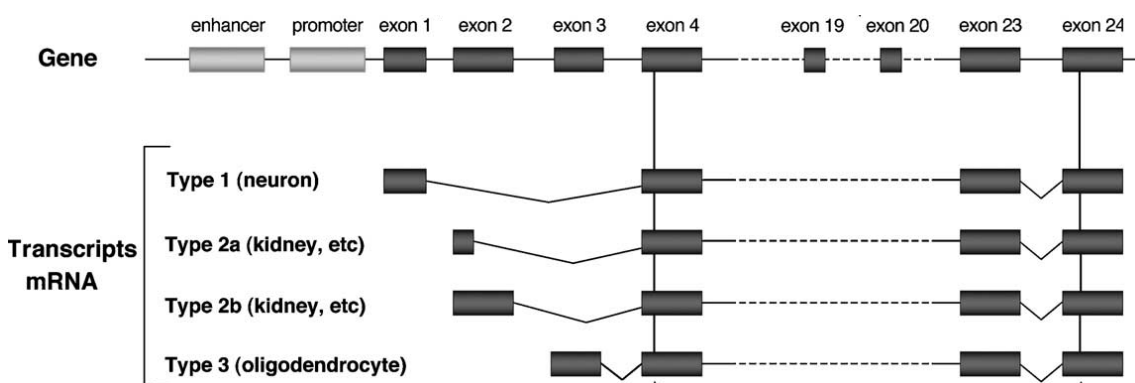


Figura 1: Representação esquemática da estrutura do gene *MME* e dos 4 transcritos de mRNA gerados (Fonte: adaptado de IWATA *et al.*, 2005).

4.3 NEPRILISINA

A enzima neprilissina (NEP), também conhecida como endopeptidase neutra, é uma metaloendopeptidase de membrana do tipo II com peso molecular de 110 KDa e 742 aminoácidos (MALFROY *et al.*, 1988). A proteína contém a sequência pentapeptídica His-Glu-Ile-Thr-His, comum à metaloendopeptidases que ligam zinco no sítio catalítico (MCKERROW, 1987). Possui um amino-terminal transmembrana, uma porção citoplasmática e o carboxi-terminal contém o sítio catalítico e localiza-se na porção extracelular (MALFROY *et al.*, 1988).

Inicialmente identificada em cérebro de roedores, a neprilissina está presente em diversos órgãos periféricos, especialmente nos rins, onde degrada o peptídeo natriurético atrial, desempenhando papel na regulação da pressão sanguínea (LORENS *et al.*, 1982; GAFFORD *et al.*, 1983). Em humanos, além dos rins, a enzima também é expressa no cérebro, pulmão, adipócitos, testículos, fibroblastos, células endoteliais, miócitos cardíacos, células musculares lisas e neutrófilos (GRAF *et al.*, 1995; TURNER *et al.*, 1997).

No sistema nervoso central, a metaloendopeptidase está presente principalmente na membrana de neurônios, localizada ao longo dos axônios e nas sinapses (FUKAMI *et al.*, 2002). A enzima cliva neuropeptídeos como encefalinas, substância P, taquininas e bradicinina, modulando seus níveis na fenda sináptica (GRIMM *et al.*, 2013).

A neprilissina também está envolvida no catabolismo do peptídeo β -amilóide no cérebro, sendo demonstrado que a enzima degrada $A\beta$ *in vitro* e *in vivo* (HOWELL *et al.*, 1995; IWATA *et al.*, 2000). O acúmulo do peptídeo $A\beta$, derivado por clivagem da proteína precursora amiloide, leva à formação das placas senis em áreas do cérebro como o hipocampo, caracterizando fisiopatologicamente a doença de Alzheimer.

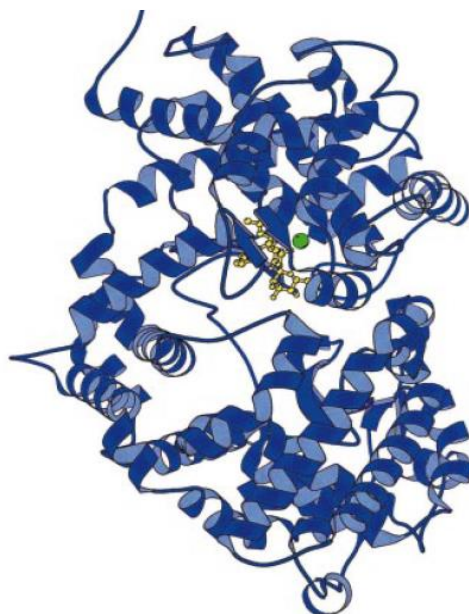


Figura 2: Estrutura cristalográfica da neprilissina complexada ao inibidor phosphoramidon (Fonte: OEFNER *et al.* 2000)

4.4 NEPRILISINA E DOENÇA DE ALZHEIMER

Através do conhecimento de que a neprilissina desempenha papel na degradação de A β (Figura 3) em regiões cerebrais vulneráveis à formação de placas senis (BARNES *et al.*, 1995), diversos estudos levantaram a hipótese de que alterações na expressão ou atividade da proteína podem causar acúmulo excessivo do peptídeo β -amilóide e levar, possivelmente, ao aumento no risco de desenvolvimento da DA (IWATA *et al.*, 2001; YASOGIMA *et al.*, 2001; IWATA *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2010).

Estudo de IWATA *et al.* (2001) demonstrou que a deficiência na neprilissina em camundongos resulta em alteração na degradação tanto de A β administrado exogenamente quanto de A β endógeno, aumentando os níveis do peptídeo no cérebro dos animais. Os mesmos autores demonstraram que o envelhecimento normal, em ratos, leva a redução da neprilissina em diferentes áreas do cérebro, sendo que no hipocampo há redução de 20% nos níveis da proteína nos animais com 132 semanas de idade em comparação com aqueles com 10 semanas. Diante

dos resultados, os autores sugerem que a deposição de A β pode ser consequência do envelhecimento normal também em humanos, visto que ocorre diminuição nos níveis de NEP com a idade (IWATA *et al.*, 2002; RUSSO *et al.*, 2005; MINERS *et al.*, 2009).

Níveis do peptídeo β -amilóide e sua relação com a neprilisina também foram estudados em tecido cerebral humano. YASOJIMA *et al.* (2001) observaram diminuição significativa nos níveis do mRNA da neprilisina em regiões cerebrais vulneráveis à formação de placas senis em indivíduos com DA quando comparados com grupo controle. Trabalho de Wang e colaboradores (2010) apontou que os níveis do mRNA de NEP, da proteína e sua atividade estão diminuídos em idosos com DA em comparação com controles cognitivamente saudáveis. Os achados evidenciam o papel chave da enzima na degradação de A β e a sugerem como potencial alvo terapêutico para a doença de Alzheimer (WANG *et al.*, 2010).

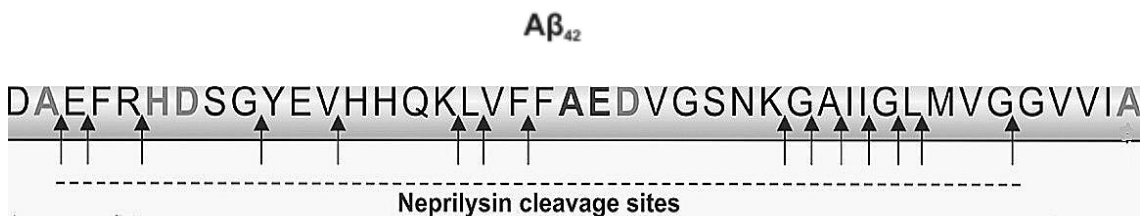


Figura 3: As setas na figura acima indicam os sítios de clivagem da neprilisina no peptídeo A β_{42} (Fonte: adaptado de GRIMM *et al.*, 2013).

4.5 POLIMORFISMOS NO GENE *MME* E DOENÇA DE ALZHEIMER

Devido ao papel da neprilisina no catabolismo do peptídeo β -amilóide e às alterações observadas em sua expressão e atividade na DA, alguns estudos investigaram associação entre polimorfismos no gene *MME* e a doença de Alzheimer (CLARIMÓN *et al.*, 2003; HELISALMI *et al.*, 2004; SAKAI *et al.*, 2004; BLOMQVIST *et al.*, 2010; MINERS *et al.*, 2012).

CLARIMÓN *et al.* (2003) estudaram um polimorfismo na região 3'UTR do gene *MME* (NEP*150 C/T) e encontraram frequência significativamente maior do genótipo CC em pacientes com diagnóstico de DA e com 75 anos ou menos quando comparados com controles da mesma faixa etária. Em estudo com 390 pacientes diagnosticados com DA e 498 controles cognitivamente saudáveis, HELISALMI *et al.* (2004) encontraram diferenças significativas nas frequências alélicas e genotípicas entre os grupos para dois polimorfismos no *MME* (rs989692 e rs3736187).

MINERS *et al.* (2012) investigaram possível relação entre sete polimorfismos no gene *MME* e a DA, níveis de NEP, sua atividade e níveis de A β em tecido cerebral humano pós-morte. Com exceção do rs56797911, não foram encontradas diferenças significativas nas frequências alélicas e genotípicas entre casos e controles para nenhum dos outros seis polimorfismos. Quatro destes polimorfismos foram associados às diferenças nos níveis de A β pós-morte e o rs9827586 tem influência sobre os níveis e atividade da neprilisina (MINERS *et al.*, 2012).

Quanto aos polimorfismos analisados neste trabalho, investigações de associações anteriores entre o rs13086740 e o rs2016846 com a DA foram feitas pelo nosso grupo, sendo que foi observado efeito protetivo de genótipo do rs2016846 contra a DA (SIMÃO-SILVA, 2014).

4.6 BUTIRILCOLINESTERASE E A DOENÇA DE ALZHEIMER

A butirilcolinesterase (BChE) é uma enzima amplamente distribuída no organismo. Pode ser encontrada no plasma, músculo liso, adipócitos, coração, substância branca do cérebro, entre outros órgãos (WESCOE *et al.*, 1947) e está presente sob cinco formas moleculares principais. A BChE tem como função a hidrólise de ésteres de colina, como a acetilcolina e, preferencialmente, a butirilcolina (SILVER *et al.*, 1974).

A BChE é uma das enzimas responsáveis pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh), porém a acetilcolinesterase (AChE) é responsável pela degradação preferencial da ACh no cérebro (WRIGHT *et al.*, 1993). A acetilcolina é

mediadora de importantes funções cognitivas comprometidas na doença de Alzheimer e está em déficit nos doentes devido à morte de neurônios que a produzem (revisado em NORDBERG *et al.*, 2013).

Assim como a AChE, a BChE é expressa em áreas cerebrais como o hipocampo e neocortex temporal, porém em níveis menores (MESULAM *et al.*, 2002). O aumento da hidrólise da acetilcolina pela BChE pode ser um mecanismo compensatório em circunstâncias onde há diminuição de AChE, como na doença de Alzheimer (LI *et al.*, 2000).

Além do papel na hidrólise da acetilcolina, a BChE pode ter funções não enzimáticas. A enzima é associada com placas senis e emaranhados neurofibrilares e pode ter papel no metabolismo destas estruturas (GÓMEZ-RAMOS & MORÁN, 1997; PODOLY *et al.*, 2009). A BChE associa-se com A β e retarda a formação das fibrilas neurotóxicas *in vitro* (DIAMANT *et al.*, 2006).

Variantes do gene *BCHE* podem influenciar o papel enzimático e não enzimático da proteína na DA. Uma das mais estudadas é a variante K (A539T), resultante do polimorfismo rs1803274, A/G no gene *BCHE* (BARTELS *et al.*, 2002). Esta variação está relacionada a redução na atividade da enzima (RUBINSTEIN *et al.*, 1978) e estudos a associam à DA (PODOLY *et al.*, 2008; LANE *et al.*, 2009).

A diminuição na atividade da AChE e o aumento ou não alteração na atividade da BChE são observados no cérebro de pacientes com DA (PERRY *et al.*, 1978). Acredita-se que a atividade da BChE, nestes casos, aumente como mecanismo compensatório em resposta a diminuição nos níveis da AChE (revisado em NORDBERG *et al.*, 2013).

Trabalho de BONO (2014) demonstra redução na atividade plasmática da BChE em pacientes com DA quando comparados a controles idosos. Esta redução deve-se principalmente à presença da doença, sendo que a atividade plasmática da enzima diminui com a progressão da demência. Este estudo sugere que a DA interfere na atividade da BChE no plasma.

Em trabalho anterior do nosso grupo foi verificada associação entre genótipos de polimorfismos no gene *MME* e níveis de atividade da BChE plasmática em idosos (SIMÃO-SILVA *et al.*, 2014). O presente estudo incluiu um controle

populacional com indivíduos de diferentes faixas etárias com o objetivo de caracterizar melhor a relação entre o gene *MME* e a atividade da BChE.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 AMOSTRAS

As amostras de DNA incluídas neste estudo foram extraídas do sangue periférico de 102 indivíduos idosos diagnosticados com doença de Alzheimer (média de idade: $77,8 \pm 8,5$), 96 idosos cognitivamente normais (média de idade: $71,6 \pm 7,6$) e de 93 doadores de sangue como controle representativo da população geral.

As amostras de casos e controles idosos são obtidas com supervisão dos médicos Dr. Mauro Piovezan e Ricardo Krause Martinez de Souza, provenientes, respectivamente, do Ambulatório de Disfunção Cognitiva do Hospital de Clínicas da UFPR (HC-UFPR) e do Ambulatório de Distúrbios da Memória e do Comportamento (ADEMEC) do Instituto de Neurologia de Curitiba. Os critérios do NIA-AA (*National Institute on Aging – NIA e Alzheimer’s Association – AA*) foram utilizados para diagnóstico de DA provável (MCKHANN *et al.*, 2011).

Os idosos dos grupos Alzheimer e controle foram submetidos ao Mini Exame de Estado Mental (MEEM) para avaliação cognitiva. Além do MEEM, os controles idosos também foram avaliados por meio do Questionário de Atividades Funcionais PFEFFER.

A amostra representativa da população geral de Curitiba é proveniente do banco de sangue HemePar.

5.2 EXTRAÇÃO DE DNA

A técnica, modificada por Lahiri e Nurnberger Jr. (1991), consiste no isolamento dos Leucócitos de onde será extraído o DNA. É coletado cerca de 6 mL de sangue em frasco contendo EDTA e trata-se os constituintes celulares do mesmo. A porção leucocitária é ressuspendida em 10 mL de TKM1 e 125 µL de IGEPAL em tubo *falcon*. O tubo é agitado até o desaparecimento dos grumos que se formam e em seguida centrifugado por 20 minutos. Em seguida, o sobrenadante é descartado e completa-se novamente com 10 mL de TKM1. Repete-se a centrifugação e a ressuspensão com TKM1 até o precipitado (DNA, proteínas e lipídeos) ficar bem claro. Em seguida, adiciona-se 800 µL de TKM2 e agita-se. A solução homogeneizada é transferida para um tubo *ependorf* e adiciona-se 50 µL de SDS 10% para dissolver o conteúdo lipídico que ainda existe no *pellet*. As amostras são colocadas em banho-maria a 55 °C *overnight*. Retira-se do banho-maria e adiciona-se 200 µL de NaCl 5M para a precipitação de proteínas, centrifuga-se por 20 minutos e em seguida transfere-se o sobrenadante (contendo o DNA) para um tubo de ensaio. Adicionam-se dois volumes de etanol absoluto gelado, tampa-se o tubo com parafilme e inverte-se delicadamente até precipitar o DNA. O DNA é transferido para um tubo *ependorf*. O tubo é mantido semi-aberto na estufa a 37 °C para que o álcool evapore. Após retirada da estufa, ressuspende-se o DNA em 300 mL de TE e deixa-o em banho-maria a 55°C por dois dias. Depois de retirado do banho-maria o DNA é armazenado à temperatura de -20°C.

5.3 GENOTIPAGEM POR *TaqMan*

Os SNPs foram genotipados por meio de *TaqMan* em aparelho de PCR em tempo real. As genotipagens do rs13086740 e do rs2016846 para casos e controles idosos foram realizadas previamente (SIMÃO-SILVA, 2014).

Para genotipagem por *TaqMan* as amostras de DNA extraído são quantificadas e diluídas a 20 ng/µL. O mix para reação de genotipagem é preparado em placa onde cada poço contém: 5 µL de *TaqMan* Universal PCR Master Mix, 2,5

μL de H_2O ultra pura, 0,5 μL de sonda *TaqMan* específica para cada SNP e 2 μL de DNA (20 ng/ μL).

Após o preparo da reação, a genotipagem é feita com o uso de aparelho para PCR em tempo real. Durante a amplificação, a DNA polimerase cliva as sondas contendo os fluoróforos VIC e FAM que estavam ligados às fitas de DNA. Ao ser liberado o fluoróforo emite sua fluorescência. Quando o sinal de fluorescência aumenta para nível detectável, ele é capturado por um detector e apresentado pelo software como uma curva de amplificação. A quantidade de sinal emitido pela sonda específica para cada SNP é proporcional à quantidade de produto sendo produzido pelas amostras (*TaqMan® SNP Genotyping Assays User Guide*, Life Technologies).

O uso do aparelho para esta genotipagem é realizado em 3 etapas. A primeira é chamada de pré-leitura, na qual é lida a fluorescência basal da placa antes da amplificação. A segunda é a amplificação em si, realizada para todos os segmentos dentro dos seguintes padrões de PCR: 1º passo de 2 minutos a 50°C; 2º passo de 10 minutos a 95°C; 3º passo repetido 50 vezes de 15 segundos a 95°C intercalados por 1 minuto a 62°C; 4º passo de 2 minutos a 60°C, o chamado “End Point”. A terceira etapa é a pós-leitura, que consiste na análise dos dados gerados antes, durante e após a amplificação, resultando no genótipo de cada indivíduo analisado.

5.4 ENSAIO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Os níveis de atividade da enzima butirilcolinesterase plasmática no controle populacional foram medidos através de ensaio de atividade enzimática baseado em espectrofotometria lida no aparelho *Tecan®*. A atividade da BChE plasmática em casos e controles idosos foi mensurada em estudo anterior (BONO, 2014).

Para o ensaio de atividade enzimática da BChE, 5 μL de amostra de plasma sanguíneo é diluída em 500 μL de H_2O destilada. A reação ocorre em placa de 96 poços. Primeiramente, à cada poço é adicionado 25 μL do plasma diluído e 220 μL de tampão fosfato com DTNB (167mg de ácido 5,5'-bisditio-2-nitrobenzóico em 1000mL

de tampão fosfato 0,1M pH 7,6) resultando num volume final de 245µL por poço. Por último, logo antes da leitura é adicionado 5µL do substrato propioniltiocolina em cada poço. A propioniltiocolina é degradada pela BChE dando origem à um produto colorido. A reação é preparada em duplicata para cada amostra.

A leitura da atividade é feita no aparelho *Tecan*® por meio do programa I-control. A definição do ciclo consiste em: Selecionar a placa (Corning 96 round transparente); selecionar os poços que serão lidos; ajustar a temperatura à 25°C; definir 4 ciclos cinéticos intervalados por 1 minuto; shaking de 3 segundos e a mensuração da absorbância deve ser feita a 410nm com múltiplas leituras por amostra (2 x 2). Os poços devem ser submetidos à leitura pelo aparelho imediatamente após pipetagem do substrato. Os arquivos com os dados de cada amostra gerados pelo aparelho são salvos e, posteriormente, os valores da absorbância são convertidos na atividade enzimática de cada amostra.

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testado nas amostras e a comparação das frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos entre os grupos foi realizada por meio do teste do qui-quadrado no programa Clump.

Após teste de normalidade de Shapiro-Wilk para a atividade da BChE nas amostras, a investigação da relação entre genótipos do *MME* e os níveis de atividade plasmática da enzima foi feita através do teste t para casos e controles idosos. O teste de Mann-Whitney foi feito no controle populacional, onde os níveis de atividade da BChE não distribuem-se normalmente.

6. RESULTADOS

6.1 ASSOCIAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS DO GENE *MME* E A DA

Na tabela 1 são mostrados os resultados da comparação entre as frequências dos alelos e dos genótipos para os SNPs do *MME* entre os grupos Alzheimer (DA), controle idoso (CI) e controle populacional (CP). Resultado estatisticamente significativo é visto na comparação das distribuições genotípicas para o rs2016846 entre casos e controle populacional ($X^2 = 4,53$; $p = 0,033$). As frequências genotípicas estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg para os três polimorfismos em todos grupos.

Tabela 1: Distribuições alélicas e genotípicas dos SNPs do gene *MME* nas amostras e o resultado da comparação das frequências entre os grupos por meio do teste do qui-quadrado. DA: casos, CI: controle idoso, CP: controle populacional. As distribuições genotípicas estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg em todas as amostras. *resultado significativo ($p < 0,05$).

Comparações das frequências alélicas e genotípicas entre as amostras										
SNP (<i>MME</i>)	Grupo	Distribuições alélicas (N)				Distribuições genotípicas (N)				
		A	G			AA	AG	GG		
rs13086740	DA	174 (85%)	30 (15%)			75 (74%)	24 (24%)	3 (3%)		
	CI	162 (84%)	30 (16%)	$\chi^2 = 0,065$	$p = 0,799$	69 (72%)	24 (25%)	3 (3%)	$\chi^2 = 0,068$	$p = 0,794$
	DA	174 (85%)	30 (15%)			75 (74%)	24 (24%)	3 (3%)		
	CP	161 (87%)	25 (13%)	$\chi^2 = 0,129$	$p = 0,719$	70 (75%)	21 (23%)	2 (2%)	$\chi^2 = 0,130$	$p = 0,718$
	CI	162 (84%)	30 (16%)			69 (72%)	24 (25%)	3 (3%)		
	CP	161 (87%)	25 (13%)	$\chi^2 = 0,362$	$p = 0,547$	70 (75%)	21 (23%)	2 (2%)	$\chi^2 = 0,280$	$p = 0,597$
		T	G			TT	TG	GG		
rs2016846	DA	124 (61%)	80 (39%)			36 (35%)	52 (51%)	14 (14%)		
	CI	107 (56%)	85 (44%)	$\chi^2 = 1,04$	$p = 0,308$	33 (34%)	41 (43%)	22 (23%)	$\chi^2 = 2,81$	$p = 0,094$
	DA	124 (61%)	80 (39%)			36 (35%)	52 (51%)	14 (14%)		
	CP	99 (53%)	87 (47%)	$\chi^2 = 2,27$	$p = 0,132$	30 (32%)	39 (42%)	24 (26%)	$\chi^2 = 4,53$	$p = 0,033^*$
	CI	107 (56%)	85 (44%)			33 (34%)	41 (43%)	22 (23%)		
	CP	99 (53%)	87 (47%)	$\chi^2 = 0,24$	$p = 0,624$	30 (32%)	39 (42%)	24 (26%)	$\chi^2 = 0,21$	$p = 0,647$
		A	G			AA	AG	GG		
rs9849573	DA	121 (59%)	83 (41%)			37 (36%)	47 (46%)	18 (18%)		
	CI	112 (58%)	80 (42%)	$\chi^2 = 0,039$	$p = 0,843$	32 (33%)	48 (50%)	16 (17%)	$\chi^2 = 0,305$	$p = 0,581$
	DA	121 (59%)	83 (41%)			37 (36%)	47 (46%)	18 (18%)		
	CP	112 (60%)	74 (40%)	$\chi^2 = 0,033$	$p = 0,856$	32 (34%)	48 (52%)	13 (14%)	$\chi^2 = 0,596$	$p = 0,440$
	CI	112 (58%)	80 (42%)			32 (33%)	48 (50%)	16 (17%)		
	CP	112 (60%)	74 (40%)	$\chi^2 = 0,139$	$p = 0,709$	32 (34%)	48 (52%)	13 (14%)	$\chi^2 = 0,263$	$p = 0,608$

6.2 RELAÇÕES ENTRE GENÓTIPOS DO *MME* E A ATIVIDADE DA BUTIRILCOLINESTERASE PLASMÁTICA

No grupo DA não é observada relação entre genótipos do *MME* e as médias de atividade enzimática da BChE (Tabela 2). Entre os controles idosos, tendência à significância do rs2016846 com a atividade média da BChE foi verificada na comparação dos genótipos GG e TT ($p = 0,0578$) e TG x TT ($p = 0,0632$) (Tabela 3). Ainda em CI, a comparação AA x AG do rs9849573 resulta em um valor de p de 0,0532. Diferença estatisticamente significativa é observada na comparação das medianas da atividade da BChE entre portadores dos genótipos AG e GG para o rs13086740 no controle populacional ($p = 0,0474$) (Tabela 4).

Tabela 2: Comparação das médias de atividade da BChE entre os genótipos dos três SNPs do *MME* no grupo Alzheimer.

Grupo Alzheimer (DA)					
SNP (<i>MME</i>)	a x b	Atividade da BChE		Teste t	p
		a (médias)	b (médias)		
rs13086740	AA x AG	5,50	5,10	1,22	0,2301
	AA x GG	5,50	5,21	0,49	0,6662
	AG x GG	5,10	5,21	-0,18	0,8712
rs2016846	TG x TT	5,15	5,65	-1,55	0,1241
	GG x TT	5,65	5,65	-0,01	0,9915
	TG x GG	5,15	5,64	-1,35	0,1927
	TT+GG x TG	5,39	5,15	1,10	0,2733
rs9849573	AA x AG	5,56	5,25	0,95	0,3452
	AA x GG	5,56	5,43	0,36	0,7185
	AG x GG	5,25	5,43	-0,55	0,5828

Tabela 3: Comparação das médias de atividade da BChE entre os genótipos dos três SNPs do *MME* no controle idoso.

Controle Idoso (CI)					
SNP (<i>MME</i>)	a x b	Atividade da BChE		Teste t	p
		a (médias)	b (médias)		
rs13086740	AA x AG	6,71	6,58	0,37	0,7131
	AA x GG	6,71	6,61	0,07	0,9534
	AG x GG	6,58	6,61	-0,02	0,9829
rs2016846	TG x TT	6,44	7,13	-1,89	0,0632
	GG x TT	6,42	7,13	-1,94	0,0578
	TG x GG	6,44	6,42	0,05	0,9604
	TG+GG x TT	6,67	7,13	-1,05	0,1353
rs9849573	AA x AG	7,05	6,42	1,97	0,0532
	AA x GG	7,05	6,66	0,74	0,4687
	AG x GG	6,42	6,66	-0,48	0,6371

Tabela 4: Comparação das medianas da atividade da BChE entre os genótipos dos três SNPs do *MME* no controle populacional.

Controle Populacional (CP)					
SNP (<i>MME</i>)	a x b	Atividade da BChE		Mann-Whitney (W)	p
		a (mediana)	b (mediana)		
rs13086740	AA x AG	4,26	4,48	683	0,6243
	AA x GG	4,26	6,26	22	0,1000
	AG x GG	4,48	6,26	3	0,0474*
rs2016846	TG x TT	4,12	4,62	446,5	0,0936
	GG x TT	4,81	4,62	371	0,8562
	TG x GG	4,12	4,81	359	0,1253
	TT+GG x TG	4,37	4,12	2061	0,2170
rs9849573	AA x AG	4,54	4,22	787	0,8567
	AA x GG	4,54	4,31	213,5	0,8905
	AG x GG	4,22	4,31	304	0,8962

* resultado significativo ($p < 0,05$)

7. DISCUSSÃO

Não foram encontrados resultados significativos nas comparações das frequências alélicas e genóticas para os SNPs rs13086740 e rs9849573 entre casos e controles. As comparações entre casos (DA) e controle populacional (CP) e entre CP e controle idoso (CI), como esperado, também não revelaram associação para nenhum dos dois polimorfismos. Portanto, este estudo não mostrou associação destes SNPs com a DA. Análise anterior do nosso laboratório também não encontrou associação do rs13086740 com a DA. Não existem outros trabalhos envolvendo estes SNPs e a DA na literatura. As distribuições alélicas e genóticas para ambos os SNPs em todas as amostras são semelhantes às encontradas em populações caucasianas (NCBI SNP database).

Para o rs2016846, não houve resultado significativo na comparação das frequências alélicas entre os grupos. Porém, quando comparadas as distribuições genóticas entre os casos e o controle populacional o resultado é significativo ($X^2 = 4,53$; $p = 0,033$). Observa-se diminuição acentuada na frequência do alelo G em homozigose nos casos. No CP a frequência do genótipo GG é de 26%, enquanto que em DA é de 14%. No controle idoso a frequência de GG é de 23%, próxima à do CP. O valor de p de 0,094 não demonstra diferença estatística entre as distribuições genóticas do rs2016846 entre DA e CI. Porém, como a comparação entre CI e CP resulta em um valor de p de 0,647, os controles são muito semelhantes. Isto indica que a associação entre casos e controles idosos pode não ter sido vista apenas devido ao tamanho amostral.

Sendo assim, os resultados encontrados podem indicar uma relação de proteção entre a presença do genótipo GG e a doença de Alzheimer, uma vez que a frequência deste genótipo é significativamente maior em controles do que em casos.

O rs2016846 está localizado em um intron dentro de um bloco haplotípico central no gene *MME*. Outros SNPs deste bloco foram associados à doença de Alzheimer (MINERS *et al.*, 2012). Uma hipótese é a de que o alelo G possa estar em desequilíbrio de ligação com alguma variante funcional nesta região do gene, que em homozigose afeta positiva e significativamente a expressão e/ou atividade da NEP.

Em resultados prévios do nosso laboratório já havia sido verificada associação da atividade da BChE plasmática e os genótipos do *MME* (SIMÃO-SILVA, 2014). Com o objetivo de caracterizar melhor o achado, neste estudo foi incluída amostra que representa indivíduos de diferentes faixas etárias da população de Curitiba como controle populacional (CP).

Para o rs13086740, o genótipo GG foi associado à atividade enzimática mais elevada quando comparado com os heterozigotos no controle populacional ($p = 0,0474$) (medianas da atividade da BChE: GG = 6,26; AG = 4,44; mediana total na amostra = 4,37). Porém, neste caso, o genótipo GG está em frequência baixa (2%), correspondendo à poucas amostras (N=2). Isto ocorre em todos os grupos estudados para este SNP. O ideal seria aumentar o número amostral para obtenção de maior confiabilidade dos resultados no que se refere aos efeitos deste polimorfismo na atividade da BChE.

Quanto ao rs2016846, nos controles idosos o alelo T em homozigose está relacionado à uma média de atividade da BChE que tende a ser maior em comparação com heterozigotos ($p = 0,0632$) e com homozigotos para o alelo G ($p = 0,0578$), (médias de atividade da BChE: TT = 7,13; TG = 6,44; GG = 6,42; média total da amostra = 6,67). No controle populacional, a comparação TG x TT para este SNP resulta em um valor de p de 0,0936. Também entre os controles idosos, a comparação das médias da atividade da BChE entre os genótipos AA e AG do rs9849573 tende a ser significativa ($p = 0,0532$). A média da atividade da enzima é ligeiramente maior entre o subconjunto da amostra que possui o alelo A em homozigose em comparação com os heterozigotos (médias da atividade da BChE: AA = 7,05; AG = 6,42; média total da amostra = 6,67).

Entre os casos, nenhum genótipo do *MME* aqui analisado foi associado com diferenças nos níveis de atividade da BChE.

A observação de uma tendência à associação entre genótipos do *MME* e diferenças na atividade da butirilcolinesterase no grupo controle idoso não encontra justificativa na literatura até o momento.

O fato dos resultados aqui discutidos estarem muito próximos da significância estatística nos controles indica que o aumento do número amostral talvez revele

associação estatisticamente significativa entre os SNPs do *MME* e atividade da BChE.

Hipótese que poderia explicar a influência dos genótipos do *MME* na atividade da BChE é a existência de algum mecanismo de regulação da expressão gênica relacionado entre os genes *MME* e *BCHE*, visto a proximidade entre eles no cromossomo 3 (*MME*: 3q25.1-q25.2 e *BCHE*: 3q26.1-q26.2). De alguma forma este mecanismo pode estar sendo influenciado pela sequência do gene *MME* ou próxima a ele. Correlação entre a expressão dos dois genes foi observada em câncer de mama (BOBERG *et al.*, 2012). A relação entre a expressão destes dois genes precisa ser melhor investigada.

Embora não haja estudo sobre uma regulação de expressão gênica comum nesta região cromossômica, sabe-se que ao redor de sítios de ligação a fatores de transcrição no gene *MME* existem ilhas CpG susceptíveis à metilação (IKAWA *et al.*, 2010; ARCHER *et al.*, 2010). DENG *et al.* (2014) demonstraram que a expressão do *MME* é regulada por metilação do DNA e acetilação de histonas em cultura neuronal de camundongos.

Relações funcionais entre as proteínas neprilisina e butirilcolinesterase não são descritas na literatura, porém ambas são associadas às patologias comuns como a doença de Alzheimer, câncer e síndrome metabólica (IWATA *et al.*, 2001; ALCANTARA *et al.*, 2005; PODOLY *et al.*, 2008; MITSUNAGA *et al.*, 2008; STANDEVEN, *et al.*, 2011; AMÉ-THOMAS *et al.*, 2015).

8. CONCLUSÃO

O presente estudo encontrou associação entre o rs2016864 e a doença de Alzheimer. O alelo G em homozigose parece ser protetivo em relação à DA. Por localizar-se em intron, fora de região regulatória conhecida e em bloco haplotípico de SNPs já associados à DA, talvez o alelo esteja em desequilíbrio de ligação com variante funcional. O achado pode auxiliar na caracterização de região do gene com maior probabilidade de conter polimorfismos associados à DA.

A tendência à relação entre os genótipos do *MME* e a atividade da butirilcolinesterase plasmática em controles podem indicar mecanismos de regulação da expressão gênica comum entre os genes *BCHE* e *MME*, além de possíveis interações funcionais entre as proteínas. Os resultados fornecidos por este trabalho e os dados da literatura até o momento são insuficientes para estabelecer relação funcional entre as proteínas e entre a expressão dos genes *MME* e *BCHE*.

Estudos são necessários para verificar efeitos das variantes na expressão e atividade da neprilisina, além de análises que investiguem a relação da expressão entre os genes *MME* e *BCHE*.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCANTARA VM, OLIVEIRA LC, REA RR, SUPPLY HL, CHAUTARD-FREIRE-MAIA EA. Butyrylcholinesterase activity and metabolic syndrome in obese patients. *Clin Chem Lab Med.* 43:285–8. 2005.

AMÉ-THOMAS P, HOELLER S, ARTCHOUNIN C, MISIAK J, BRAZA MS, JEAN R, LE PRIOL J, MONVOISIN C, MARTIN N, GAULARD P, TARTE K. CD10 delineates a subset of human IL-4 producing follicular helper T cells involved in the survival of follicular lymphoma B cells. *Blood.* 125(15):2381-5. 2015.

BARNES K, DOHERTY S, TURNER A.J. Endopeptidase-24.11 is the integral membrane peptidase initiating degradation of somatostatin in the hippocampus. *J. Neurochem.* 64: 1826–1832. 1995.

BENTAHIR M, NYABI O, VERHAMME J, *et al.* Presenilin clinical mutations can affect gamma-secretase activity by different mechanisms. *J Neurochem.*, 96: 732–42. 2006.

BETTENS K, SLEEGERS K, BROECKHOVEN CV. Genetic insights in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 12: 92-104. 2013

BLOMQVIST ME, MCCARTHY S, BLENNOW K, ANDERSSON B, PRINCE JA. Evaluation of neprilysin sequence variation in relation to CSF β -Amyloid levels and Alzheimer disease risk. *Int J Mol Epidemiol Genet.* 1(1): 47-52. 2010.

BOBERG DR, BATISTELA MS, PECHARKI M, RIBEIRO EM, CAVALLI IJ, LIMA RS, URBAN CA, FURTADO-ALLE L, SOUZA RL. Copy number variation in ACHE/EPHB4 (7q22) and in BCHE/MME (3q26) genes in sporadic breast cancer. *Chemico-Biological Interactions* 203: 344–347. 2013.

BONO GF, Investigação de associação entre a Butirilcolinesterase e a Doença de Alzheimer. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Genética. 2014.

BRAAK H, BRAAK E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta neuropathol.* 82: 239–59. 1991.

CARAMELI P.; BARBOSA M. T. Como diagnosticar as quatro causas mais frequentes de demência. *Rev Bras Psiquiatr.*24(Supl I):7-10. 2002.

CARSON JA, TURNER AJ. β -Amyloid catabolism: roles for neprilysin (NEP) and other metallopeptidases? *Journal of Neurochemistry.* 81: 1-8. 2002.

CIRO A, PARK J, BURKHARD G, et al. Biochemical differentiation of cholinesterases from normal and Alzheimer's disease cortex. *Curr Alzheimer Res.* 9(1):138–143. 2012.

CLARIMÓN J, MUÑOS FJ, BOADA M, TÀRRAGA L, SUNYER J, BERTRANPETIT J, COMAS D. Possible increased risk for Alzheimer's disease associated with neprilysin gene. *J Neural Transm.* 110: 651-657. 2003.

CORDER, E.H.; LANNFELT, L.; BOGDANOVIC, N.; FRATIGLIONI, L.; MORI, H. - The role of apõe polymorphisms in late-onset dementias. *Cell Mol Life Sci.* 54: 928-34. 1998.

COYLE JT, PRICE DL, DELONG MR. Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science.* 219(4589):1184–1190. 1983.

D'ADAMIO L, SHIPP MA, MASTELLER EL, HEINHERZ EL. Organization of the gene encoding common acute lymphoblastic leukemia antigen (neutral endopeptidase 24.11): Multiple miniexons and separate 5' untranslated regions. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA.* 86: 7103-7107. 1989.

DE STROOPER B, SAFTIG P, CRAESSAERTS K, *et al.* Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature.* 391: 387–90. 1998.

DENG Y, LU X, LIU L, LI T, ZHANG Y, GUO X, YU G. Expression of neprilysin gene is associated with methylation and histone modification on promoter in mouse neuroblastoma Neuro-2a cells. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology.* 30(8): 810-3. 2014.

DI FEDE G, CATANIA M, MORBIN M, *et al.* A recessive mutation in the APP gene with dominant-negative effect on amyloidogenesis. *Science.* 323: 1473–77. 2009.

DIAMANT S, PODOLY E, FRIEDLER A, et al. Butyrylcholinesterase attenuates amyloid fibril formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103(23):8628–8633. 2006.

EPPERT, K.; WUNDER, J. S; ANELIUNAS, V.; TSUI, L.; SCHERER, S. W.; ANDRULIS, I. L. Altered expression and deletion of RMO1 in osteosarcoma. *Int. J. Cancer*. 114: 738–746. 2005.

ERDOS E.G., AND SKIDGEL R.A. Human neutral endopeptidase 24.11 (NEP, enkephalinase); function, distribution and release. *Adv. Exp. Med. Biol*. 240: 13–21. 1988.

FARRER LA, CUPPLES LA, HAINES JL, et al. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. *JAMA*. 278: 1349–56. 1997.

FROTA NAF, NITRINI R, DAMASCENO BP, FORLENZA O, DIAS-TOSTA E, SILVA AB, JUNIOR EH, MAGALDI RM. Critérios para diagnóstico de Doença de Alzheimer. *Dement Neuropsychol*. 5 (suppl 1):5-10. 2011.

FUKAMI S, WATANABE K, IWATA N, HARAOKAJ, LU B, GERARD NP. Abeta degrading endopeptidase neprilysin in mouse brain: synaptic and axonal localization inversely correlating with Abeta pathology. *Neurosci.Res*. 43, 39–56. 2002.

GAFFORD, J.T., SKIDGEI, R.A., ERDOS, E.G. AND HERSH, L.B. *Biochemistry* 22: 3265-3271. 1983.

GALLUCCI N, J.; TAMELINI, M. G.; FORLENZA. O.V. Diagnóstico diferencial das demências. *Rev. Psiq. Clin*. 32 (3): 119-130. 2005.

GOATE A, CHARTIER-HARLIN MC, MULLAN M, *et al.* Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*. 349: 704–06. 1991.

GRAF K, KOEHNE P, GRAFE M, ZHANG M, AUCH-SCHWELK W, FLECK E. Regulation and differential expression of neutral endopeptidase 24.11 in human endothelial cells. *Hypertension*. 26:230–235. 1995.

GRIMM MOW, METT J, SATAHLMANN CP, HAUPENTHAL VJ, ZIMMER VC, HARTMANN T. Neprilysin and Ab clearance: impact of the APP intracellular domain in NEP regulation and implications in Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 5(98). 2013.

HELISALMI S, HILTUNEN M, VEPSALAINEN S, LIVONEN S, MANNERMAA A, LEHTOVIRTA M, KOIVISTO AM, ALAFUZOFF L, SOININEN H. Polymorphisms in neprilysin gene affect the risk of Alzheimer's disease in Finnish patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 75: 1746-1748. 2004.

HOWELL S, NALBANTOGLU J, CRINE P. Neutral endopeptidase can hydrolyze beta-amyloid (1-40) but shows no effect on beta-amyloid precursor protein metabolism. *Peptides*. 16: 647–652. 1995.

ISHIMARU & SHIPP. Analysis of the Human CD10/Neutral Endopeptidase 24.11 Promoter Region: Two Separate Regulatory Elements. *Blood*, Vol 85, No 11: 3199-3207. 1995.

IWATA N, HIGUCHI M, SAIDO TC. Metabolism of amyloid-beta peptide and Alzheimer's disease. *Pharmacol Ther*. 108: 129-148. 2005.

IWATA N, TAKAKI Y, FUKAMI S, TSUBUKI S, SAIDO TC. Region-Specific Reduction of A_β-Degrading Endopeptidase, Neprilysin, in Mouse Hippocampus Upon Aging. *Journal of Neuroscience Research*. 70:493–500. 2002.

IWATA N, TSUBUKI S, TAKAKI Y, SHIROTANI K, LU B, GERALD NP, GERALD C, HAMA E, LEE HJ, SAIDO TC. Metabolic Regulation of Brain A_β by Neprilysin. *Science*. 292: 1550-1552. 2001.

IWATA N, TSUBUKI S, TAKAKI Y, WATANABE K, SEKIGUCHI M, HOSOKI E. Identification of the major Abeta1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition. *Nat.Med*. 6: 143–150. 2000.

KUMAR-SINGH S, THEUNS J, VAN BROECK B, *et al*. Mean age-of-onset of familial alzheimer disease caused by presenilin mutations correlates with both increased Abeta42 and decreased Abeta40. *Hum Mutat*. 27: 686–95. 2006.

LAHIRI & NURNBERGER. Protocolo para extração de DNA, adaptado da técnica do NONIDET P-40. 1991.

LEVY E, CARMAN MD, FERNANDEZ-MADRID IJ, *et al*. Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. *Science*. 248: 1124–26. 1990.

LEVY-LAHAD E, WASCO W, POORKAJ P, *et al*. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science*. 269: 973–77. 1995.

LI C, BOOZE RM, HERSH LB. Tissue-specific expression of rat neutral endopeptidase (Neprilysin) mRNAs. *J Biol Chem.* 270: 5723-5728. 1995.

LI C, HERSH LB. Characterization of the promoter region of the rat neprilysin gene. *Arch Biochem Biophys.* 358: 189-195. 1998.

LORENS, C., MALFROY, B., SCHWARTZ, J.-C., GACEL, G., ROQUES, B.P., ROY, J., MORGAT, J.L., JAVOY-AGID, F, AGID, Y. Enkephalin Dipeptidyl Carboxypeptidase (Enkephalinase) Activity: Selective Radioassay, Properties, and Regional Distribution in Human Brain. *J. Neurochem.* 39: 1081-1089. 1982.

MALFROY B, KUANG WJ, SEEBURG PH, MASON AJ, SCHOFIELD PR. Molecular cloning and amino acid sequence of human enkephalinase (neutral endopeptidase). *Published by Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division).* 229(1): 206-210. 1988.

MCKHANN GM, KNOPMAN DS, CHERTKOW H, HYMAN BT, JACK CR, KAWAS CH *et al.* The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 7(3): 263–269. 2011.

MCKERROW JH. Human Fibroblast Collagenase Contains an Amino Acid Sequence Homologous to the Zinc-binding Site of *Serratia* Protease. *The Journal of Biological Chemistry.* 262(13): 5943. 1987.

MINERS J.S., BAIG S., TAYLER H., KEHOE P.G., LOVE S. Neprilysin and insulin-degrading enzyme levels are increased in Alzheimer disease in relation to disease severity. *J. Neuropathol.Exp.Neurol.* 68, 902–914. 2009.

MINERS S, VAN HELMOND Z, BARKER R, PASSMORE PA, JOHNSTON J A, TODD S, MCGUINNESS BM, PANZA F, SERIPA D, SOLFRIZZI V, LOVE S, PRINCE JA, KEHOE PG. Genetic variation in MME in relation to neprilysin protein and enzyme activity, A β levels, and Alzheimer's disease risk. *Int J Mol Epidemiol Genet.* 3(1): 30-38. 2012.

NAGASE, T.; KIKUNO, R.; HATTORI, A.; KONDO, A.; OKUMURA, K.; OHARA, O. Prediction of the Coding Sequences of Unidentified Human Genes. XIX. The complete Sequences of 100 New cDNA Clones from Brain Which Code for Large Proteins in vitro. *Dna Research.* 7: 347-355. 2000.

NITRINI, R., CARAMELLI, P. HERRERA, JR. *et al.* Incidence of dementia in a community-dwelling brazilian population. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.*18(4): 241-6, 2004.

NORDBERG A, BALLARD C, SOMOGYI M. A Review of Butyrylcholinesterase as a Therapeutic Target in the Treatment of Alzheimer's Disease. *Prim Care Companion CNS Disord.* 15(2). 2013.

OJOPI EPB, BERTONCINI AB, NETO ED. Apolipoproteína E e a doença de Alzheimer. *Rev. Psiq. Clín.* 31 (1);26-33. 2004.

PERRY EK, PERRY RH, BLESSED G, *et al.* Changes in brain cholinesterases in senile dementia of Alzheimer type. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 4(4): 273–277. 1978.

PERRY E, WALKER M, GRACE J, *et al.*, Acetylcholine in mind: a neurotransmitter correlate of consciousness? *Trends Neurosci.* 22(6): 273-280. 1999.

PODOLY, E., SHALEV, D.E., SHENHAR-TSARFATY, S., BENNETT, E.R., BEN ASSAYAG, E., WILGUS, H., LIVNAH, O., SOREQ, H. The butyrylcholinesterase K variant confers structurally derived risks for Alzheimer pathology. *J. Biol. Chem.*, v.284, p. 17170–17179. 2009.

ROCCHI A, PELLEGRINI S, SICILIANO G, MURRI L. Causative and susceptibility genes for Alzheimer's disease: a review. *Brain Res Bull.* 61:1-24. 2003.

ROGAEV EI, SHERRINGTON R, ROGAEVA EA, *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.* 376: 775–78. 1995.

RUSSO R., BORGHI R., MARKESBERY W., TABATON M., ANDPICCINI A. Neprylisin decreases uniformly in Alzheimer's disease and in normal aging. *FEBS Lett.* 579, 6027–6030. 2005.

SAKAI A, UJIKE H, NAKATA K, TAKEHISA Y, IMAMURA T, UCHIDA N, KANZAKI A, YAMAMOTO M, FUJISAWA Y, OKUMURA K, KURODA S. Association of the neprilysin gene with susceptibility to late-onset Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 17: 164-169. 2004.

SHERRINGTON R, ROGAEV EI, LIANG Y, *et al.* Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature.* 375: 754–60. 1995.

SIMÃO-SILVA DP. Estudo de associação entre variantes dos genes *BCHE*, *APOE*, *SLITRK3*, *MME* e *GHRL* e perfil das proteínas ApoE, as colinesterases BChE/AChE e a doença de Alzheimer. Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-

Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Genética. 2014.

SLEEGERS K, BROUWERS N, GIJSELINCK I, *et al.* APP duplication is sufficient to cause early onset Alzheimer's dementia with cerebral amyloid angiopathy. *Brain*. 129: 2977–83. 2006.

STANDEVEN KF, HESS K, CARTER AM, RICE GI, CORDELL A, BALMFORTH AJ, LU B, SCOTT DJ, TURNER AJ, HOOPER NM, GRANT PJ. Neprilysin, obesity and the metabolic syndrome. *Int J Obes (Lond)*. 35(8): 1031–1040. 2011.

TOMIYAMA T, NAGATA T, SHIMADA H, *et al.* A new amyloid beta variant favoring oligomerization in Alzheimer's-type dementia. *Ann Neurol*. 63: 377–87. 2008.

TURNER A.J. ISAAC R.E COATES D. The neprilysin (NEP) family of zinc metalloendopeptidases: genomics and function. *Bioessays* 23: 261–269. 2001.

TURNER AJ, TANZAWA K. Mammalian membrane metallopeptidases: NEP, ECE, KELL, and PEX. *Faseb J*. 11:355–364. 1997.

WANG S, WANG R, CHEN L, BENNETT DA, DICKSON DW, WANG DS. Expression and functional profiling of neprilysin, insulin degrading enzyme and endothelin converting enzyme in prospectively studied elderly and Alzheimer's brain. *J Neurochem*. 115(1): 47-57. 2010.

YASOGIMA K, MCGEER EG, MCGEER PL. Relationship between beta amyloid peptide generating molecules and neprilysin in Alzheimer disease and normal brain. *Brain Research*. 919: 115-121. 2001.