



artigos breves_ n. 7

Alterações fenotípicas e genéticas do metabolismo do ferro numa população Portuguesa com doença de Alzheimer: potenciais implicações no conhecimento da fisiopatologia e no diagnóstico desta demência

Ângela C. Crespo^{1,2}, Bruno Silva³, Liliana Marques^{1,4},
Erica Marcelino⁵, Carolina Maruta⁵, Sónia Costa⁶,
Ângela Timóteo⁶, Arminda Vilares¹, Frederico Simões Couto⁵,
Paula Faustino³, Ana Paula Correia⁷, Ana Verdelho⁵,
Graça Porto⁸, Manuela Guerreiro⁵, Ana Herrero⁶,
Cristina Costa⁶, Alexandre de Mendonça⁵, Madalena Martins^{5,2}
e Luciana Costa^{1,4}

¹ Departamento Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis, INSA.

² Instituto Gulbenkian de Ciência.

³ Departamento de Genética Humana, INSA.

⁴ BioFIG-FCUL, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

⁵ Unidade Neurológica de Investigação Clínica, Instituto de Medicina Molecular.

⁶ Hospital Prof. Dr. Fernando Fonseca, EPE.

⁷ Hospital Magalhães Lemos, EPE.

⁸ Instituto Biologia Molecular e Celular.

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa progressiva e constitui o tipo de demência mais frequente em todo o mundo. Alguns estudos anteriores identificaram vários fatores ambientais e genéticos associados a um maior risco de desenvolver esta patologia. No entanto, a DA apresenta-se como uma doença heterogénea complexa cujos mecanismos que conduzem ao seu aparecimento não estão ainda esclarecidos. Presentemente, existe evidência científica que indica a implicação numa desregulação da homeostasia do ferro (Fe) na patogénese da DA (^{1,2}). Assim, o objetivo principal deste estudo populacional consistiu na investigação sobre o papel do metabolismo do Fe no desenvolvimento da DA, nomeadamente a procura de potenciais biomarcadores sistémicos e/ou genéticos que possam contribuir para um melhor conhecimento sobre a fisiopatologia desta doença e consequentemente ajudar no seu diagnóstico precoce e/ou no desenho de novos alvos terapêuticos.

Neste âmbito, mediram-se marcadores bioquímicos do metabolismo do Fe a nível sistémico numa população de 116 doentes com Alzheimer e 98 controlos saudáveis (*Tabela 1*), de modo a pesquisar diferenças significativas destes parâmetros entre os dois grupos. Por outro lado, testou-se não só a associação entre um conjunto de genes-alvo envolvidos na mobilização, transporte e regulação do Fe a nível celular/sistémico e o risco de desenvolver esta doença, como também se estudou a sua expressão génica (níveis de RNA mensageiro, mRNA) nas células mononucleares do sangue periférico. Para estas análises, foram realizadas a genotipagem de alta densidade de polimorfismos (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs) selecionados para estes

genes e a técnica de PCR quantitativo (qRT-PCR), respetivamente. O gene *APOE* (apolipoproteína E) foi também genotipado visto continuar a ser até ao presente o gene de suscetibilidade mais consistentemente associado com a forma “esporádica” da DA.

Os resultados obtidos mostraram a existência de uma diferença significativa ($P=0,003$; overall MANCOVA) no perfil bioquímico do *status* de Fe medido a nível periférico nos doentes com AD comparativamente aos controlos, devida essencialmente à diminuição da concentração de Fe em circulação (*Tabela 2*). Em relação à análise genotípica, encontraram-se 6 polimorfismos em genes relacionados com o metabolismo do Fe associados com a suscetibilidade à DA (*Tabela 3*). Para além da replicação dos resultados obtidos anteriormente em relação ao gene da *APOE* ($P=0,0007$) também encontramos associação da DA com 3 polimorfismos dos genes da transferrina (*TF*, $0,0147 < P < 0,0537$) e com cada um dos polimorfismos do receptor 2 da transferrina (*TFR2*, $P=0,0055$), ferroportina (*SLC40A1*, $P=0,0210$) e da aconitase 1 (*ACO1*, $P=0,0258$). Finalmente, os resultados de qRT-PCR mostraram uma diminuição significativa ($P < 0,001$) dos níveis de mRNA dos genes *TFR1* e *TFR2*, e *SLC40A1* nos doentes com DA comparativamente aos controlos.

Em suma, neste estudo populacional verificou-se a existência de alterações importantes no metabolismo do Fe em doentes com DA tanto a nível fenotípico (bioquímico e transcripcional) como a nível genético. Neste contexto e de acordo com os resultados obtidos, propomos a hipótese de que a redução da concentração sérica de Fe observada nos doentes de DA possa ser devida a uma diminuição da exportação de Fe celular em consequência de uma possível alteração funcional da ferroportina, o único transportador de Fe para fora da célula identificado em mamíferos. Desta forma, o Fe poderá estar a acumular-se intracelularmente, onde contribuirá para o aumento do stress oxidativo a nível local. A ferroportina é expressa no cérebro, onde os efeitos dos danos oxidativos se poderão sentir de forma mais grave devido à maior sensibilidade das células neuronais. Muito embora possa ser expectável que os efeitos mais graves de uma desregulação no metabolismo de Fe na DA ocorram a nível do sistema nervoso central, o presente trabalho indica que é possível que tais anomalias se possam refletir no perfil de marcadores do metabolismo Fe medidos a nível sistémico. A avaliação destes perfis em amostras populacionais de DA, integrada com a análise de novos genes candidatos envolvidos nestes mecanismos e associados à DA, constitui assim uma abordagem inovadora ao estudo da complexidade desta doença. A identificação, neste trabalho, de genes cruciais para a manutenção da homeostasia do Fe celular associados à DA abre novas perspetivas para a identificação de biomarcadores para o diagnóstico precoce desta patologia e de novos alvos terapêuticos.

→ continua



artigos breves_ n. 7

Tabela 1: Características clínicas e demográficas da população em estudo.

Características da Amostra	Doentes de Alzheimer (n = 116)	Controlos (n = 89)
Idade média \pm dp (anos)	76.6 \pm 6.9	68.2 \pm 7.7
Género	F/M (n=92/24)	F/M (n=51/38)
Idade média de Início da Doença \pm dp (anos)	70.0 \pm 7.9	-
MMSE	13.0 \pm 6.1	28.8 \pm 1.9
CDR	1.7 \pm 0.8	0

F: Feminino; M: Masculino; MMSE: do inglês "Mini Mental-State Examination"; CDR, do inglês "Clinical Dementia Rating"; dp: desvio padrão.

Tabela 2: Parâmetros bioquímicos medidos no soro de doentes com DA e controlos, e respectiva análise multivariada de variância.

Bioquímica	Doentes com DA		Controlos		Valores Ref.	Mancova (P)	Overall Mancova (P)
	n	mean \pm SD	n	mean \pm SD			
[Fe] (μ g/dL)	116	76.63 \pm 26.36	84	86.67 \pm 25.18	37.0 – 158.0	4.19 (0.003)	6.27 (0.003)
[Transferrina] (mg/dL)	114	250.96 \pm 43.23	84	267.86 \pm 44.28	200.0 – 400.0	3.16 (0.016)	
Saturação da Transferrina (%)	113	23.43 \pm 8.17	83	25.70 \pm 7.91	25.0 – 50.0	2.25 (0.066)	
[Ferritina] (ng/ μ L)	101	126.91 \pm 70.00	81	138.40 \pm 83.91	6.0 – 397.0	2.69 (0.033)	

Valores de P significativos (<0.05), em negrito.

Tabela 3: Resultados significativos da associação alélica de SPN em genes relacionados com o metabolismo de ferro e APOE com a Doença de Alzheimer.

Gene	SNP	Alelo Associado	Alelos associados n/frequência		P - value	OR (95% IC)
			AD (2n=232)	CTRL (2n=178)		
SLC40A1	rs1439816	C	44 / 0.190	19 / 0.107	2,10E-02	1.96 (3.49-1.10)
TF	rs4428180	G	32 / 0.138	37 / 0.210	5,37E-02	0.60 (1.01-0.36)
TF	rs1358024	T	24 / 0.104	30 / 0.174	4,15E-02	0.55 (0.98-0.31)
TF	rs8177277	C	7 / 0.030	15 / 0.085	1,47E-02	0.33 (0.84-0.13)
TFR2	rs7385804	C	90 / 0.395	83 / 0.539	5,50E-03	0.56 (0.37-0.84)
ACO1	rs10970973	C	76 / 0.349	42 / 0.244	2,58E-02	1.66 (2.59-1.06)
APOE ϵ 4	rs429358	C	58 / 0.271	18 / 0.123	7,00E-04	2.64 (4.71-1.48)

Mb: Megabases; OR: odds ratio; 95% IC: 95% intervalo de confiança; Valores de P significativos (<0.05), em negrito.

Financiamento

Fundação Astrazeneca e INSA, IP

Referências bibliográficas:

- (1) Zecca L, Youdim MB, Riederer P, et al. Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. Nat Rev Neurosci. 2004 Nov;5(11):863-73.
- (2) Crichton RR, Dexter DT, Ward RJ. Brain iron metabolism and its perturbation in neurological diseases. J Neural Transm. 2011 Mar;118(3):301-14. doi: 10.1007/s00702-010-0470-z.