

Ana Karolina Seco das Neves Freitas

Défice Cognitivo Ligeiro e Doença de Alzheimer: as diferenças numa perspetiva proteómica

Tese de mestrado em Biotecnologia Farmacêutica

Janeiro/2017



Ana Karolina Seco das Neves Freitas

Défice Cognitivo Ligeiro e Doença de Alzheimer: as diferenças numa perspetiva proteómica

Dissertação de mestrado em Biotecnologia Farmacêutica, orientada pelo Doutor Bruno Manadas (Centro de Neurociências e Biologia Celular) e pelo Professor Doutor Luís Pereira de Almeida (Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra) e apresentada à
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Janeiro/2017



Este projeto foi realizado sob a orientação do Doutor Bruno Manadas, no grupo Life Sciences Mass Spectrometry do Centro de Neurociências e Biologia Celular (Universidade de Coimbra, Portugal), , financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (UID/NEU/04539/2013, PEstC/SAU/LA0001/2013-2014 e SFRH/BD/88419/2012), e co-financiado pelo Programa COMPETE (Programa Operacional Factores de Competitividade), pelo QREN, a União Europeia (FEDER – Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional), e pela Rede Nacional de Espectrometria de Massa (RNEM), sob o contracto REDE/I506/REM/2005.

As amostras utilizadas neste trabalho foram colhidas no âmbito do projeto financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (2009-2012) - PIC/IC/83206/2007: "Early Diagnosis of Alzheimer's Disease: evaluation of recent classification criteria and proposal of new diagnostic tools", coordenado pela Professora Doutora Isabel Santana, com o consentimento e aprovação da comissão de ética do CHUC.

The present work was performed in the Life Sciences Mass Spectrometry group under the supervision of Doutor Bruno Manadas in the Center for Neuroscience and Cell Biology (University of Coimbra, Portugal), supported by the Portuguese Foundation for Science and Technology (UID/NEU/04539/2013, PEstC/SAU/LA0001/2013-2014 e SFRH/BD/88419/2012), and co-financed by "COMPETE Programa Operacional Factores de Competitividade, QREN, the European Union (FEDER – Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional) and by The National Mass Spectrometry Network (RNEM) under the contract REDE/I506/REM/2005

The samples used in this study were collected under the project funded by the Foundation for Science and Technology (2009-2012) - PIC/IC/83206/2007: " Early Diagnosis of Alzheimer's Disease: evaluation of recent classification criteria and proposal of new diagnostic tools", coordinated by Professor Isabel Santana, with the consent and approval of the CHUC ethics committee.

“Eu sei que meu trabalho é apenas uma gota no oceano,
mas sem ele o oceano seria menor.”

Madre Teresa de Calcutá

Agradecimentos

Chegou a hora de agradecer a todos que direta e indiretamente contribuíram para que conseguisse chegar ao fim de mais uma etapa na minha vida.

Em primeiro lugar, quero agradecer ao Doutor Bruno Manadas, por acreditar em mim e depositar toda a sua confiança neste projeto, pelo apoio e em todo ensinamento. Obrigada pela oportunidade de realizar um dos meus sonhos, este projeto.

Obrigada ao Professor Doutor Luís Almeida, por toda disponibilidade e toda a ajuda ao longo deste ano.

Obrigada a Professora Doutora Isabel Santana e ao Professor Doutor Alexandre Mendonça, por toda disponibilidade e colaboração para a execução deste projeto.

Não posso deixar de agradecer à Cátia que foi durante este ano a minha “salva vida”, que me acompanhou diariamente, me ensinou e me ajudou em todos os momentos, sempre com muita atenção e carinho. Obrigada por toda preocupação e pelo incansável apoio, principalmente nesta fase final. Mais uma vez muito obrigada, foste imprescindível!

Obrigada à Vera por arranjar sempre um tempo para me ensinar e me ajudar, por todo conhecimento, preocupação e disponibilidade, mesmo distante. Obrigada à Sandra, por toda ajuda e pela constante disponibilidade e preocupação. À Margarida e à Joana que também sempre me ajudaram quando precisei (“valeu” os alongamentos que proporcionaram um momento de descontração ao final do dia). À Andreia, pelos incontáveis momentos partilhados e por teres sido uma grande parceira, muito obrigada.

À equipa do Modelo, em especial à Cristina, por toda confiança e apoio. Deu gosto de trabalhar convosco!

Obrigada aos meus amigos que estiveram sempre presentes e que me acompanharam ao longo destes anos de perto ou de longe: Gil, Inês, Joana, Sara, Sofia, Tiago, Teresa e Vinhas. Adriana, Ana, Ângela, Carla, Carina, Delfina, Eliana, Inês, Joana, Sara e ao Pedro (Obrigada pelo apoio informático) e em especial à Isabel, por todo apoio e carinho.

Obrigada ao meu Pai e a Maria, pelo apoio e atenção ao longo destes anos.

Um grande obrigada à minha prima Rita, pela pessoa especial que te tornas-te. Por toda ajuda (esta tese tem a tua cara). Não há distância que nos separe!

Obrigada à “Família Neves”, por todo amor e união, por todos os momentos e todas as experiências que se pode ter quando se tem uma verdadeira família, obrigada por serem o meu porto de abrigo. À minha avó e avô (em memória) pelos exemplos e por ensinarem os principais valores da vida, obrigada por tudo, mas principalmente por todo amor.

À pessoa mais importante na minha vida e responsável por estar aqui, obrigada mãe. Obrigada por todas as adversidades que passamos, foram elas que me tornaram a pessoa que hoje sou. Obrigada pelo exemplo de luta, de força, persistência, coragem e amor. Ensinaste-me a acreditar, a viver a vida com fé e um sorriso no rosto. Obrigada por todo esforço, por acreditar em mim mais do que eu mesma, obrigada por me amar tanto. Esta vitória não é minha é nossa!

E por fim, ao meu noivo Micael, por todos esses anos de companheirismo e apoio, principalmente nos momentos mais difíceis. Obrigada por lutar ao meu lado e me ajudar a alcançar os meus sonhos, por toda paciência, dedicação, por todos os dias ouvires os meus desabafos e aguentares a “barra” e principalmente por todo amor.

Um muito obrigada a todos.

Resumo

A doença de Alzheimer (DA) é responsável atualmente por cerca de 50-70% de todos os casos de demência, prevendo-se que ultrapasse 75 milhões de doentes até 2030.

Clinicamente a doença é caracterizada por perda cognitiva gradual, levando a total perda das funções neurológicas e motoras. A transição entre os sintomas do envelhecimento normal e a doença é caracterizada como Déficit Cognitivo Ligeiro (DCL), esta condição aumenta a probabilidade de desenvolver a DA, estimando-se que aconteça em 1/3 dos casos. DA é caracterizada ao nível molecular pela presença de placas amiloides e tranças neurofibrilares de Tau.

A falta de informação sobre os mecanismos da doença não permite que haja um diagnóstico definitivo. Quanto mais avançada está a doença maior a precisão do diagnóstico, que normalmente é realizado por exclusão de outras doenças, levando a um acompanhamento inadequado do doente. A base do diagnóstico é a partir de vários exames, como por exemplo o recurso a biomarcadores, que têm vindo a chamar a atenção dos clínicos.

Os biomarcadores existentes para esta patologia, embora sejam eficazes no apoio a um diagnóstico mais preciso, ainda não permitem a distinção com DCL. Desta forma, neste projeto realizou-se um estudo proteómico para encontrar possíveis biomarcadores que preencham essas lacunas.

Foram analisadas e estudadas 14 e 16 amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com doença de Alzheimer e Déficit Cognitivo Ligeiro, respetivamente. A análise foi realizada por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS/MS) e quantificada através do método SWATH (do inglês Sequential Window Acquisition of all Theoretical mass spectra). As proteínas de interesse foram selecionadas por comparação entre 4 grupos: DA vs. DCL; DA (feminino vs. Masculino); feminino (DA vs. DCL) e masculino (DA vs. DCL).

Após análise por diferentes métodos, foram selecionadas ao todo 26 proteínas de interesse. Observou-se uma possível relação da doença com o aparecimento precoce, uma vez que as proteínas Apolipoproteína A1 e a Protrombina apresentam alteração acentuada nos indivíduos mais jovens. Observou-se também que as proteínas Fibulina I e IGHG3 estão significativamente aumentadas nos indivíduos masculinos com DA podendo indicar uma

diferença entre os géneros. Esta informação também é corroborada pela Análise de Componentes Principais (PCA) dos grupos de comparação entre os géneros, onde se observou uma tendência na separação entre os géneros.

As restantes proteínas selecionadas estão maioritariamente relacionadas com as placas amiloides e processos inflamatórios, no entanto também foram selecionadas proteínas relacionadas com processos de stresse oxidativo e com os microtúbulos. Realizou-se ainda uma PCA para o grupo DA Vs. DCL destas proteínas, que permitiu observar uma tendência na separação entre as patologias.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer, Défice Cognitivo Ligeiro, Líquido cefalorraquidiano, proteómica, SWATH, LC-MS/MS.

Abstract

Actually, Alzheimer's disease (AD) accounts about 50-70% of all dementia cases, and is expected to surpass 75 million patients by 2030.

Clinically, AD is characterized by gradual cognitive loss, leading to complete loss of neurological and motor functions. The transition between the symptoms of normal aging and the disease is characterized as Mild Cognitive Impairment (MCI), and this condition increases the probability of developing AD, which is estimated to occur in 1/3 of the cases. AD is characterized by the presence of amyloid plaques and Tau neurofibrillary tangles in the brain.

The lack of information on the mechanisms of the disease doesn't allow an AD diagnosis, especially at the earliest stage. The more advanced the disease is, the greater the accuracy of the diagnosis, which is usually performed by excluding other diseases, leading to an inappropriate monitoring of the patient. The diagnosis is based on several tests, such as the use of biomarkers, which have been drawing attention of medical community.

Regardless of being used to support a more accurate diagnosis, the current biomarkers for AD do not allow a distinction between AD and MCI. Thus, a proteomic study was carried out in the present study, in order to find possible biomarkers that fill these gaps.

Thereby, 14 and 16 cerebrospinal fluid (CSF) samples from patients with AD and MCI respectively, were analyzed and studied. The analysis was performed by liquid chromatography coupled to sequential mass spectrometry (LC-MS/MS) and quantified by the SWATH (Sequential Window Acquisition of all Theoretical mass spectra) method. The proteins of interest were selected for comparison between 4 groups: AD vs. DCL; AD (female vs. male); Female (AD vs. MCI) and male (AD vs. MCI).

Twenty-six proteins of interest were selected after analysis with different methodologies. A possible relation between the disease with early onset was observed, since the proteins Apolipoprotein AI and Prothrombin present a marked change in the youngest individuals. It was also observed that the proteins Fibulin I and IGHG3 are significantly upregulated in the male patients with AD and this may be an indication of a gender difference in AD. This indication is also corroborated by a Principal Component Analysis (PCA), where a tendency to separate the two genders is observed.

The remaining selected proteins were found to be mostly related to amyloid plaques and inflammatory processes, although also proteins related to oxidative stress and the microtubules were selected. By performing a PCA analysis comparing AD vs. MCI using these

selected proteins it was possible to observe a tendency in the separation of the two pathologies.

Keywords: Alzheimer's Disease, Mild Cognitive Impairment, cerebrospinal fluid, proteomics, SWATH, LC-MS/MS.

Índice

1	Introdução	1
1.1	Doença de Alzheimer	3
1.1.1	Manifestações clínicas.....	4
1.1.2	Etiologia.....	5
1.1.3	Fisiopatologia da doença.....	7
1.1.3.1	Placas amiloides	7
1.1.3.2	Tranças neurofibrilares de Tau (TNFs).....	9
1.1.4	Diagnóstico.....	9
1.2	Biomarcadores no LCR.....	11
1.3	Espectrometria de massa	13
2	Objetivos.....	17
3	Materiais e Métodos.....	21
3.1	Amostras	23
3.2	Precipitação das proteínas.....	24
3.3	Testes preliminares	24
3.3.1	Teste de avaliação da preparação da amostra.....	24
3.3.2	Teste de reprodutibilidade da técnica SWATH-MS.....	25
3.4	Estudo LCR.....	25
3.5	Processamento das amostras.....	26
3.5.1	SDS-PAGE (Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio).....	26
3.5.2	Extração e purificação dos péptidos	27
3.5.3	Preparação dos péptidos para análise LC-MS/MS.....	27
3.5.4	Identificação e quantificação de proteínas	28
3.6	Análise de dados	29
3.7	Seleção das proteínas de interesse.....	30

4	Resultados e Discussão	31
4.1	Testes preliminares.....	33
4.1.1	Teste de avaliação da preparação da amostra.....	33
4.1.2	Teste de reprodutibilidade do procedimento	34
4.2	Estudo proteómico do LCR.....	34
4.2.1	DLC Vs. DA.....	35
4.2.2	Seleção das proteínas de interesse	36
4.2.3	Estudo das proteínas selecionadas.....	44
5	Conclusão.....	51
7	Referências bibliográficas	55
8	Material suplementar	65
8.1	Modo de aquisição de dados SWATH	67
8.2	Teste de reprodutibilidade do procedimento	68
8.3	DA Vs. DCL.....	69
8.4	Análise dos perfis proteicos obtidos por PCA.....	70
8.5	Estudo das proteínas selecionadas	74

Lista de Abreviaturas

ACN – Acetonitrilo

ADAS – Do ingles, cog - Alzheimer's Disease Assessment Scale- cognitive subscale

ADL – Do ingles, Activities of Daily Living

AF – Ácido Fórmico

ApoE – Apolipoproteína E

APP - Proteína Precursora Amiloide

DA – Doença de Alzheimer

DAE – Doença de Alzheimer Esporádica

DAF – Doença de Alzheimer Familiar

DCL – Défice Cognitivo Ligeiro

EEG – Eletroencefalograma

IDA – Aquisição Dependente de Informação (do ingles, Independent Data Aquisition)

LCR – Líquido Cefalorraquidiano

m/z – Razão massa/carga

MMSE - Mini- Exame do Estado Mental (Mental State Examination)

MS – Espectrometria de Massa (do ingles, Mass Spectrometry)

MS/MS – Espectrometria de Massa sequencial

PET -Tomografia por Emissão de Protões (do ingles, Positron emission tomography)

FHEs – Filamentos Helicoidais Emparelhados

PS1 – Presenilina 1

PS2 – Presenilina 2

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

SNC – Sistema Nervoso Central

SWATH – Sequential Window Acquisition of all Theoretical mass spectra

TAC – Tomografia Axial Computadorizada

TNFs – Tranças Neurofibrilares de proteína Tau

TOF – Tempo de voo

viii | Lista de Abreviaturas

β A– Péptido β Amiloide

I Introdução

1.1 Doença de Alzheimer

A Doença de Alzheimer afeta cerca de 46,8 milhões de pessoas em todo o mundo, constituindo um problema de saúde crítico. Devido ao facto de que a patologia está diretamente relacionada com a idade e nos últimos anos a esperança média de vida tem sido cada vez maior, principalmente em países mais desenvolvidos, o número de pessoas afetadas tende consequentemente a aumentar. Dados do relatório anual da Federação Mundial de Associações de Alzheimer, estima que os valores atuais dupliquem ultrapassando os 75 milhões até 2030.

Sendo esta uma doença de longa duração, incapacitante e de grande impacto na sociedade, principalmente em países como Portugal onde grande percentagem da população é envelhecida, os custos suportados pelo serviço nacional de saúde são elevados. Segundo dados de 2015, na europa ocidental cada doente com demência custa em média 35 mil dólares ao estado por ano, este valor engloba custos diretos em tratamentos e custos indiretos, totalizando mundialmente quase 818 mil milhões de dólares. Como referido anteriormente, com o aumento do número de idosos afetados, prevê-se que este valor dispare para 2 Biliões, como representado na Figura 1. (Prince et al., 2015)

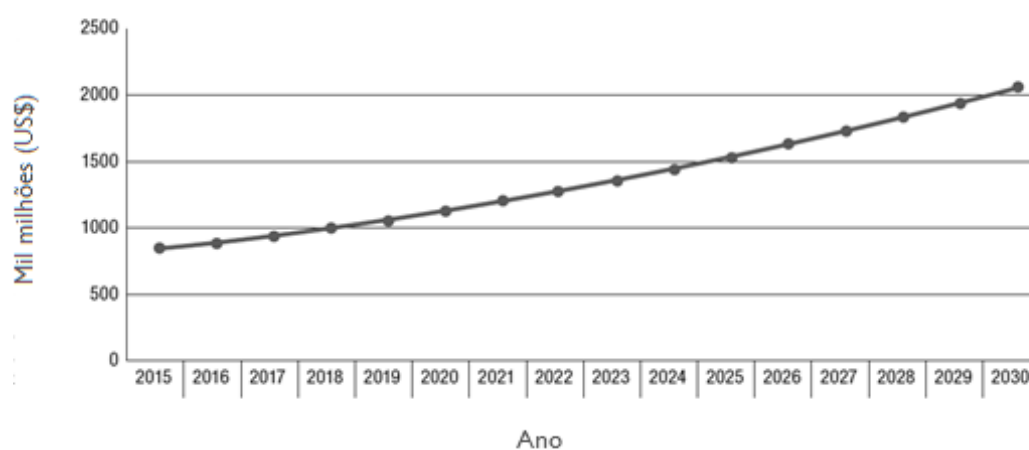


Figura 1 - Custo totais com Demências entre 2015 e 2030. (Adaptado do Prince et al., 2015).

A primeira descrição sobre a doença de Alzheimer foi em 1907 no artigo “über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde” (Peculiar doença degenerativa do córtex cerebral) publicado pelo neuropatologista alemão Alois Alzheimer. (Alzheimer et al., 1995)

4| Introdução

Neste artigo, Dr^o. Alzheimer relata o quadro clínico da doente August D. internada aos 51 anos com sintomas avançados de perda de memória, desorientação, alucinações e perda da noção de tempo e espaço. Faleceu após 4 anos e meio em estado vegetativo.

Após análise do tecido cerebral *post-mortem*, foi observado perda neuronal no córtex e alterações neurofibrilares juntamente com deposição de proteínas.(Alzheimer et al., 1995)

1.1.1 Manifestações clínicas

Atualmente 50-75 % de todos os casos considerados como demência são Doença de Alzheimer (DA), afetando maioritariamente mulheres. (Andersen et al., 1999) Segundo o Instituto Nacional do Envelhecimento Americano, a DA é uma doença neuronal irreversível e progressiva, destrói lentamente a memória e capacidades de pensamento levando à incapacidade de realizar as tarefas mais simples (Niu et al.).

A nível fisiopatológico, ocorre atrofia cerebral devido a perda sináptica e consequente morte neuronal levando a uma diminuição significativa no seu volume, exemplificados a seguir na Figura 2. Estes danos ocorrem maioritariamente nas zonas do hipocampo e córtex entorrinal. (Sereniki and Vital, 2008) (Falco et al., 2016) (Holtzman, Morris and Goate, 2011)

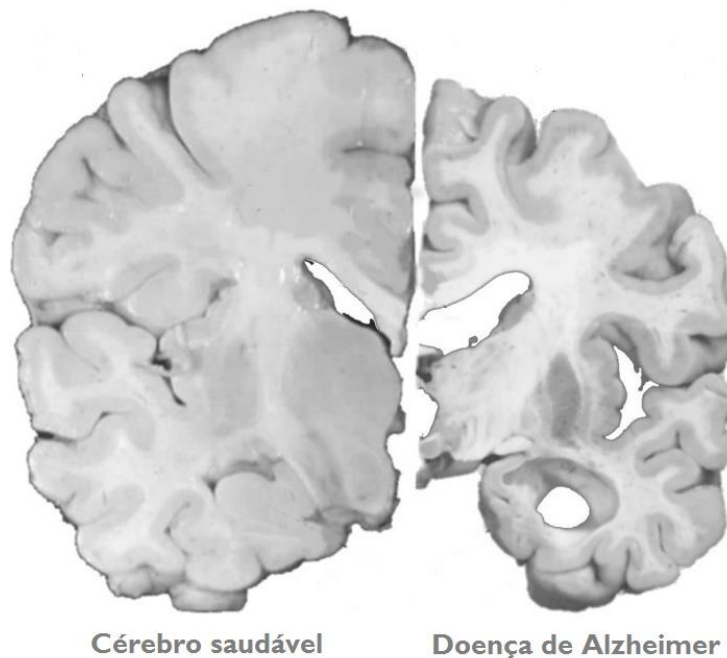


Figura 2 – Atrofia cerebral de um cérebro com DA em comparação com um cérebro saudável. Adaptado do (Allen, Watson and Dawbarn, 2011).

Apesar dessas alterações, os sintomas podem demorar a aparecer, tornando-se perceptíveis de forma suave. Nem todos os doentes apresentam sintomas da mesma forma e com a mesma gravidade, embora haja um padrão para os três estádios principais. A primeira fase da doença caracteriza-se por uma leve perda de memória, muitas vezes confundida com o processo normal de envelhecimento, embora o declínio neuronal já esteja fortemente instalado. Associada à perda de memória, ocorre dificuldade de expressão, e uma ligeira alteração na performance cognitiva que fará a realização de tarefas mais lenta e com mais erros. Há desorientação no tempo e espaço e em muitos casos apatia, levando muitas vezes a que o doente se isole e desenvolva depressão.

Muitos doentes nesta fase são diagnosticados com Défice Cognitivo Ligeiro (DCL), onde apresentam também os sintomas de perda de memória, porém sem danos cognitivos que influenciam no cotidiano do doente, sendo por isso considerado como a transição entre o envelhecimento normal e a primeira manifestação de demência. Pessoas com DCL, podem vir a desenvolver a DA, embora um número significativo de pacientes não demostrem desenvolver qualquer tipo de demência, podendo até mesmo reverter o quadro de perda de memória. Estima-se que 1/3 dos casos diagnosticados com DCL anos mais tarde desenvolvam a DA.

Numa fase moderada, com a progressão da doença e o agravamento dos sintomas, os doentes tornam-se cada vez mais dependentes, há um comprometimento grave das capacidades cognitivas com grandes dificuldades na comunicação falada/escrita e na percepção da mesma. Ocorre completa perda da memória recente, alterações psicológicas e comportamentais, alteração da noção de dia/noite e com isso perturbações do sono. Nesta fase começam a surgir dificuldades de locomoção, nos sentidos (audição, visão, tato e paladar), com perda da autonomia nas tarefas diárias.

No estágio mais avançado da doença, ocorre perda praticamente total das funções mentais. Os doentes perdem os movimentos e acabam por ficar acamados, extremamente debilitados e totalmente dependentes.

1.1.2 Etiologia

A DA pode ser designada de duas formas consoante a sua precedência:

1) Doença de Alzheimer familiar (DAF), representa entre 2-7% dos casos e os primeiros sintomas podem se manifestar em pessoas com idades compreendidas entre os 40-60 anos. (Selkoe, 2001) Esta forma está diretamente relacionada com mutações autossómicas

6| Introdução

dominantes em pelo menos um de três genes associados a doença (APP, PSI e PS2)(Barage and Sonawane, 2015; Hooper, Lovestone and Sainz-Fuertes, 2008). O gene da Proteína Precursora de Amiloide (APP) localizado no cromossoma 21, foi associado à doença ao ser estudado em indivíduos com Síndrome de Down que apresentaram sintomas de demência precocemente.(Zhang et al., 2011) A APP é uma proteína transmembranar, clivada na via amiloidogénica sequencialmente pela enzima β -secretase (BACE 1) e γ -secretase originando desta forma os péptidos β -amiloide. (Sereniki and Vital, 2008)

Outra proteína associada à forma genética da doença é a Presenilina I (PSI), cujo gene se encontra no cromossoma 14. (Castro-Chavira et al., 2015) Apesar de ainda não estar bem explicito todos os processos em que a PSI está envolvida, sabe-se que interage com a γ -secretase influenciando a produção de β -Amiloide. Pode ainda contribuir para a hiperfosforilação da proteína tau, através da interação com a sintetase do glicogénio.

O gene que codifica a proteína Presenilina 2 (PS2) está presente no cromossoma 1. Esta proteína apresenta 67% de homologia com a PSI, atuando desta forma nos mesmos mecanismos.(Kimberly et al., 2000) (Parihar and Hemnani, 2004).

2) Outra etiologia da doença representa 93-98% dos diagnósticos e acontecem maioritariamente em idosos com mais de 60 anos, sem qualquer gene implícito, sendo considerado como Doença de Alzheimer Esporádica (DAE). Neste caso, os mecanismos que causam a patologia ainda se encontram por esclarecer, embora, muitos estudos tenham vindo a relacionar esta com outras patologias como diabetes, doenças vasculares, depressão e doenças inflamatórias (Bertram, Lill and Tanzi, 2010) (National Institute of Aging, 2015). Apesar da DAE não apresentar relações diretas geneticamente, mutações no cromossoma 19 no gene que codifica a proteína Apolipoproteína E (ApoE), pode estar associada a um risco acrescido de desenvolvimento da doença de Alzheimer. A ApoE apresenta polimorfismos determinados pelos alelos ϵ 2, ϵ 3 e ϵ 4. Embora a forma ApoE3 seja mais comum, a forma que tem sido relacionada com a patologia é a ApoE4, pois está relacionada com a deposição acelerada dos péptidos de β -Amiloide, por ser menos eficiente na remoção destes. Além disto, exerce uma função ativa no transporte lipídico no sistema nervoso central (SNC), envolvido na regeneração e degeneração dos tecidos nervosos. (Poirier et al., 1993; Tsai et al., 1994) (Deane et al., 2008)

1.1.3 Fisiopatologia da doença

Embora a DA possa ter etiologias diferentes, as características moleculares em ambas as formas são as mesmas, sendo estas, a formação de placas amiloides compostas por péptidos de β -Amiloide (β A) e tranças neurofibrilares constituídos pela proteína Tau (TNFs), representadas a seguir na figura 3. (Castro-Chavira et al., 2015)

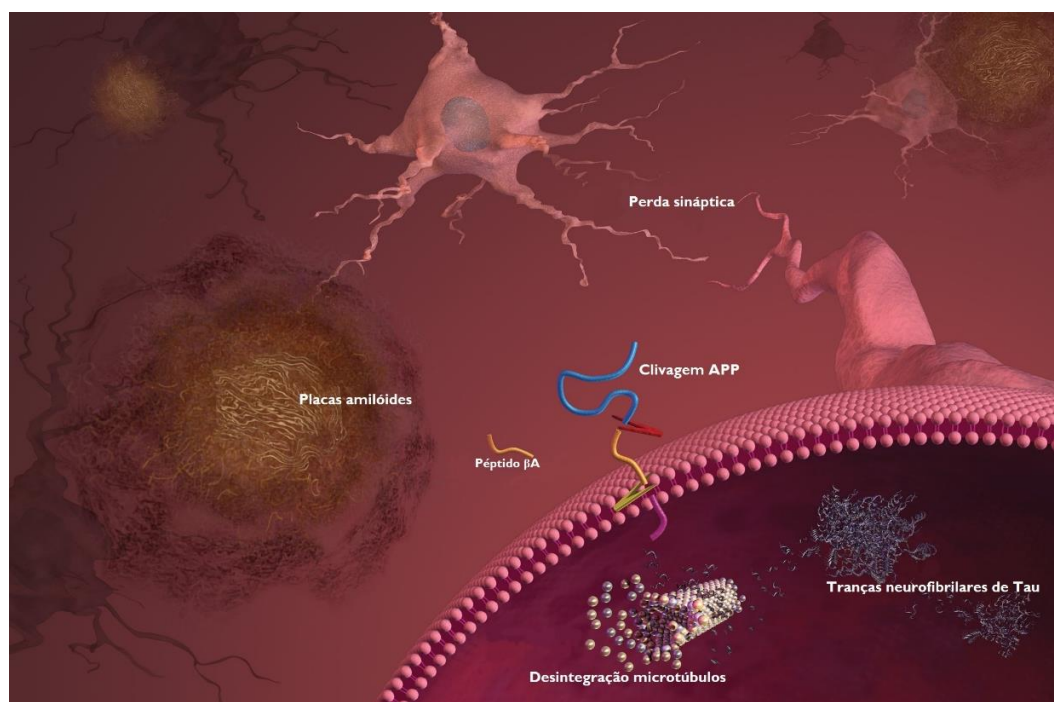


Figura 3 – Características moleculares da doença de Alzheimer. A clivagem da proteína APP origina o péptido β -Amiloide, que ao não ser degradado irá agregar-se formando as placas amiloides. A fosforilação da proteína tau e posterior agregação, irá levar à desintegração dos microtúbulos e à formação das tranças neurofibrilares. Ambos os fatores, resultam na perda sináptica e consequente morte neuronal. (Imagem foi cortesia do National Institute on Aging/National Institutes of Health)

1.1.3.1 Placas amiloides

Muitos investigadores acreditam que o que desencadeia a doença de Alzheimer é a formação de placas amiloides, corroborados pelos três genes associados a doença, uma vez que estão envolvidos nos mecanismos que levam à formação do péptido β A. (Vassar, 2004) O processo de formação do péptido β A, está representado na figura 4.

8| Introdução

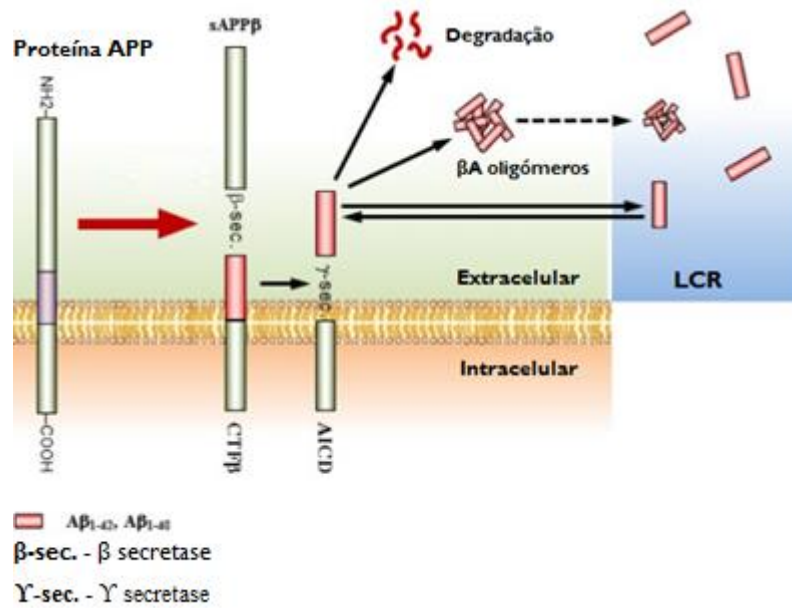


Figura 4 - Esquema representativo da formação do péptido βAmiloide. A proteína APP é sequencialmente clivada pela enzima β-secretase e γ-secretase originando o fragmento AICD, sAPPβ e βA. O péptido βA pode ser degradado, ou aglomerar-se, originando as placas amiloides ou seguir para o LCR. Adaptado do (Kang et al., 2014).

O péptido β-amiloide é originado a partir da APP. Esta proteína é clivada no seu domínio C-terminal pela enzima β-secretase originando dois fragmentos, sAPPβ, libertado para o citoplasma e o fragmento membranar C99, que é posteriormente clivado pela γ-secretase originando o péptido βA₁₋₄₀ (mais frequente, porém não patológico), βA₁₋₄₂ (principal componente das placas amiloides) e o fragmento AICD (domínio intracelular da APP). (Vassar, 2004; Zhang et al., 2011)

Não se sabe ao certo o que se sucede ao fragmento AICD, porém alguns estudos têm demonstrado a sua potencial atividade na regulação da transcrição de genes. (Multhaup et al., 2015) (Qadi, Alipour e Beattie, 2007a)

O péptido βA₁₋₄₀ é menos hidrofóbico e associa-se com as células endoteliais dos microvasos sendo desta forma posteriormente degradado, ao contrário o péptido βA₁₋₄₂ que por ser mais hidrofóbico tende a agregar-se, originando desta forma as placas amiloides extracelulares, que irão bloquear a sinalização entre as células nas sinapses. (Castro-Chavira et al., 2015)

Vários estudos, porém, afirmam que a perda neuronal e a disfunção cognitiva serão uma consequência não da acumulação destes fragmentos, mas sim do desequilíbrio entre a sua agregação e degradação. (Barage and Sonawane, 2015)

1.1.3.2 Tranças neurofibrilares de Tau (TNFs)

As TNFs são compostas por filamentos helicoidais emparelhados (FHEs) a partir da proteína tau fosforilada (P-Tau), formando estruturas intraneuronais. Pensa-se que estão presentes desde o início da doença, embora não se saiba se a sua formação ocorre antes ou depois da deposição dos péptidos de β A. Apesar das TNFs estarem associadas à DA, não são uma característica distintiva, uma vez que estão presentes em outras doenças e também no processo normal do envelhecimento, embora de uma forma mais subtil. A proteína Tau está associada aos microtúbulos, presentes no interior dos neurónios, e tem um papel importante na associação e estabilização dos mesmos embora esse papel seja dependente do seu estado de fosforilação. (Schraen-Maschke et al., 2008) (Maccioni et al., 2010)

A proteína tau é expressa em seis isoformas que diferem entre si pela presença ou ausência de uma ou duas inclusões no terminal amino (N-terminal) e por um grupo de três (3R) ou quatro (4R) repetições no terminal carboxílico (C-terminal), sendo este último o domínio que interage com a tubulina dos microtúbulos, promovendo a estabilização, manutenção estrutural e consequentemente o transporte axonal. Essa interação é regulada pelo grau de fosforilação da proteína tau, que por sua vez é regulado por proteínas cinases e fosfatases. Em cérebros saudáveis encontra-se ligadas à proteína Tau cerca de dois grupos fosfatos ao contrário do que se encontra nas TNFs que apresentam entre seis a oito grupos fosfatos por cada molécula, mostrando desta forma que na DA a tau está hiperfosforilada. Quando hiperfosforilada, torna-se insolúvel, ocorrendo quebra de ligação com os microtúbulos e formando desta forma os filamentos helicoidais emparelhados (PHFs) que se aglomeram originando os tranças neurofibrilares. (Sergeant, Delacourte and Buee, 2005)

Uma vez que a proteína Tau é responsável pela dinâmica dos microtúbulos, maior componente do citoesqueleto, a sua fosforilação anormal afeta funções biológicas e morfológicas nos neurónios favorecendo a formação de agregados, bloqueando o tráfego intracelular e desregulando o transporte axonal e dendrítico. (Iqbal et al., 2010)

1.1.4 Diagnóstico

Apesar de todos os avanços a nível do conhecimento molecular da doença, não existe até ao momento um diagnóstico preciso e é normalmente resultado da exclusão de outras formas de demência. Apesar do diagnóstico definitivo ser *post-mortem*, onde se torna possível

observar as mudanças morfológicas características da DA, em fases mais avançadas os exames neurológicos podem ter uma precisão de cerca de 90%.(Humpel, 2011)

Para se chegar ao diagnóstico de DA é necessário um conjunto de exames de avaliação cognitiva e avaliação fisiológica. Como os primeiros sintomas são de declínio neuronal que pode inclusive ser um processo normal do envelhecimento, foram criados diversos critérios, usados internacionalmente, para o diagnóstico que podem diferir de acordo com o tipo de demência, sendo também variáveis consoante o grau de escolaridade.

De acordo a Direção Geral de Saúde (DGS) os primeiros testes são baseados nos critérios propostos no *Diagnostic and Statistical Manual*, 4ª edição revista (DSM-IV-TR) (American Psychiatric Association, 2000) e os definidos na *International Classification of Diseases* (ICD-10) (World Health Organization, 1993), embora este último imponha que o défice cognitivo esteja presente há pelo menos seis meses. Para o diagnóstico mais preciso de DCL, são normalmente utilizados os critérios propostos pelo *European Alzheimer's Disease Consortium* (Portet et al., 2006) ou do *National Institute on Aging - Alzheimer's Association* (Albert et al., 2011). De outra forma, para o diagnóstico de doença de Alzheimer sugere-se os critérios definidos pelo DSM-IV-TR juntamente com os propostos pelo *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke – Alzheimer's Disease and Related Disorders Association* (NINCDS-ADRDA). (Portugal. Direção-Geral da Saúde, 2011)

Comprovada a alteração das funções cognitivas, podem ser realizados exames para avaliação morfológica, como Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ou Tomografia Axial Computadorizada (TAC) que apresentam, em estados avançados da doença, diminuição do volume cerebral. Exames de Tomografia por Emissão de Positrões (PET), com auxílio de compostos radioativos, avaliam o metabolismo da glucose, o fluxo sanguíneo cerebral e a função de neurotransmissores. No diagnóstico de doença de Alzheimer, é utilizado o Composto B de Pittsburgh (PiB-¹¹C) que se irá ligar às placas de β -Amiloide, originando um mapeamento da distribuição e quantidade de proteína. Outra forma de avaliação é a partir do uso do), capaz de monitorizar a atividade bioelétrica que se apresenta diminuída na DA. (Tsai et al., 1994)

A nível molecular, pode ser realizada análise ao líquido cefalorraquidiano (LCR) na busca de biomarcadores, como as proteínas β A e Tau, que juntas se tornam características da DA. Embora atualmente estes biomarcadores apenas sejam quantificáveis em fases mais avançadas da doença, ou seja, quando já há um grau de comprometimento molecular grave, fazendo com que apenas sirva como auxílio no diagnóstico, aumentando a precisão do mesmo.(Hooper, Lovestone and Sainz-Fuertes, 2008) (Ross and Poirier, 2004) (Qadi et al., 2007b)

1.2 Biomarcadores no LCR

Um biomarcador é caracterizado por medir e avaliar objetivamente um indicador de processos biológicos normais e patogénicos, ou respostas farmacológicas numa intervenção terapêutica. (Biomarkers Definitions Working, 2001)

Para o seu uso ser viável é necessário ter em conta algumas características essenciais, tais como, ser acessível e não invasivo, baixo custo de procedimento, ser específico para uma patologia, sensível e sem grandes variações por mecanismos externos, reprodutível e apresentar exatidão e precisão, sendo este um ponto crucial, visto que variações significativas dos valores inter-laboratorias não concedem confiança no método. (Blennow et al., 2015)

No caso da DA, os três biomarcadores usados atualmente não conseguem englobar todas estas características, embora juntos sejam fortes candidatos. A proteína β A encontra-se diminuída em indivíduos com DA, porém estudos demonstrem que esta característica também se encontra noutras patologias. A proteína Tau total (T-tau) e Tau fosforilada (P-tau), ao contrário do que acontece com a proteína β A, apresenta níveis mais altos. Embora tenha vindo a ser demonstrado que a P-tau é possivelmente um biomarcador mais específico para DA, uma vez que reflete o estado de fosforilação da Tau e não apenas o dano e estado de neurodegeneração, como é o caso da T-tau. (Blennow, 2004) (Schraen-Maschke et al., 2008)

Como já foi referido as características de um biomarcador, e uma vez que o LCR utilizado para análise é obtido através de punção lombar, torna-se uma técnica invasiva, tardia, dispendiosa e de difícil acesso, não sendo por isso utilizada como diagnóstico na clínica regular. Neste caso, o melhor fluido para análise de biomarcadores é na periferia, como o sangue e urina, porém como ainda está em fase inicial de aquisição de conhecimentos, o uso do LCR é imprescindível. O líquido cefalorraquidiano é o fluido que envolve a medula espinal e o encéfalo exercendo uma função protetora, nutritiva e de defesa, mantendo desta forma a atividade cerebral. Uma vez que está em contato direto com os agentes patológicos, a sua composição demonstra a bioquímica do sistema nervoso central no momento. Embora a concentração de proteína no LCR seja à volta de 100 vezes inferior que a concentração no plasma, o seu proteoma apresenta 80% de semelhança, sendo que apenas 20% das proteínas são provenientes apenas do cérebro. (Lygirou, Makridakis and Vlahou, 2015) (Dimas and Puccioni-Sohler, 2008)

Alguns estudos têm demonstrado que indivíduos com DCL que apresentam variações nestas proteínas têm um risco 17 vezes acrescido de desenvolver DA (Diniz and Forlenza,

12| Introdução

2007). Ainda que já haja muitas evidências que demonstrem a utilidade desses marcadores biológicos, é necessário um esforço científico acrescido para ultrapassar as barreiras atuais para a sua utilização. Deste modo, a busca de novos biomarcadores ou biomarcadores complementares aos existentes é imprescindível, para que se torne possível a utilização de terapêuticas mais precisas, com melhor acompanhamento da progressão da doença e principalmente do prognóstico e que permitam a diferenciação entre outras demências. (Humpel, 2011)

É essencial haver um diagnóstico mais preciso, que demonstre realmente o processo biológico da degeneração, mas que por outro lado seja de fácil acesso, baixo custo e que seja detetável no início desse processo. Embora já existam muitos estudos nesse sentido, o caminho para o desenvolvimento de biomarcadores com estas características é longo e dispendioso, como podemos observar na Figura 5.

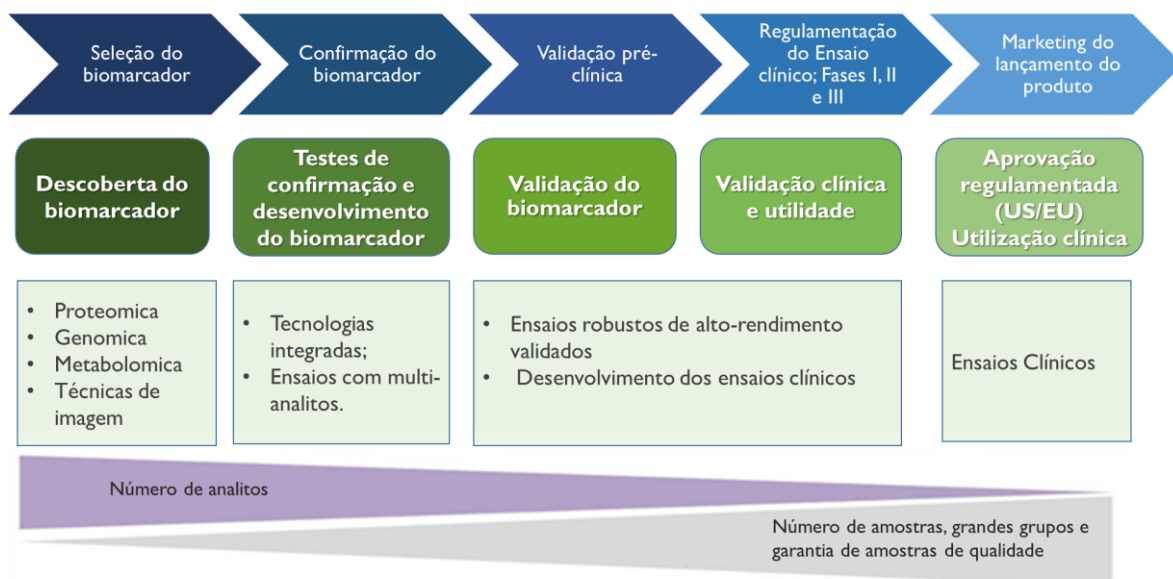


Figura 5 -Representação do processo de descoberta de um biomarcador. A imagem resume todo o processo desde a pesquisa e seleção de um conjunto de possíveis biomarcadores até à etapa final, onde o biomarcador está aprovado para uso clínico.

Como a imagem demonstra, o primeiro passo é a seleção de possíveis biomarcadores que pode ser realizado por diversas abordagens, sendo uma destas a abordagem proteômica.

Como grande percentagem da DA se deve a causas ambientais ainda por confirmar, surge a necessidade de estudar além da alteração do genoma todo o meio envolvente. O estudo das proteínas vem então disponibilizar a compreensão do perfil patológico, as alterações decorrentes deste e é uma ajuda imprescindível no estudo da terapêutica, uma vez que, nos transmite a inter-conectividade entre complexos e redes de sinalização e modificações pós-traducionais que variam no tempo e espaço. (Barbosa et al., 2012)

Para a realização do estudo proteômico, atualmente, o método de espectrometria de massa tem se tornado muito apelativo uma vez que, permite a identificação e quantificação de um número elevado de proteínas numa única experiência e durante um espaço de tempo reduzido. Esta análise pode ser realizada de duas formas, através da proteína intacta, com medição precisa da sua massa molecular ou através da digestão da proteína pela tripsina e consequente formação de péptidos, sendo neste caso, realizada a identificação com base na sequência e massa/carga dos péptidos. (Dass, 2007)

1.3 Espectrometria de massa

Espectrometria de massa é uma técnica analítica que permite identificar e quantificar moléculas através da medição do rácio massa/carga dos iões em fase gasosa, sendo atualmente uma das técnicas mais versáteis e abrangentes na área química e bioquímica. (Kinter e Sherman, 2000)

O processo de análise das amostras por espectrometria inclui várias etapas, estas podem ser realizadas por diferentes equipamentos com características distintas, na Figura 6 está representado um dos processos que pode ser utilizado.

I4| Introdução

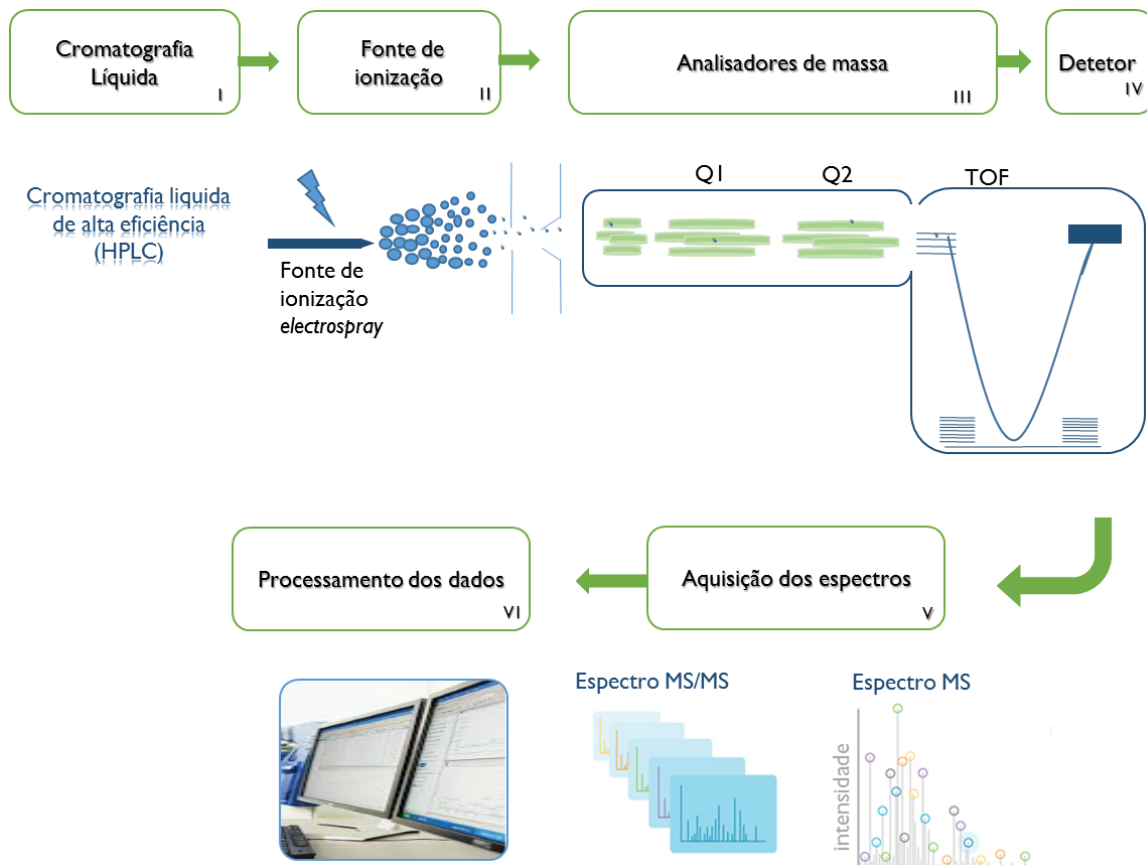


Figura 6 - Principais etapas da espectrometria de massa e exemplo de um tipo de análise. I- Cromatografia líquida de alta eficiência, é a primeira fase do processo e irá permitir a separação dos péptidos. II- Fonte de ionização *electrospray*, a partir de elevadas quantidades de energia. III- Analisador de massa: Q1-Seleciona o ião precursor consoante o seu m/z , Q2 – Realiza a fragmentação dos péptidos. TOF- Analisa o m/z dos iões resultantes da fragmentação. IV- O detetor irá medir o tempo que o ião levou a percorrer desde a fonte de aceleração até ao detetor. V- Aquisição de espectros MS, espectro de todos os iões presentes e aquisição do espectro MS/MS, espectro referente aos fragmentos de cada ião selecionado previamente. VI- Processamento de dados realizado a partir de programas informáticos.

A primeira etapa do processo é uma separação dos péptidos previamente digeridos, pela técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês High Performance Liquid Chromatography).

O HPLC é composto por duas fases, fase estacionária, que reveste a coluna e é constituída, no caso desta análise, por longas cadeias de grupos metilénicos (C_{18}) ligados a esferas de sílica. Outra fase, fase móvel, é constituída por um eluente hidrofílico, como por exemplo a água ou acetonitrilo. A separação dos péptidos é obtida consoante a sua polaridade, através de um gradiente de concentração da fase móvel. Este passo permite que haja uma redução da complexidade da amostra que entra no espectrómetro. (Barbosa et al., 2012)

Após sofrerem separação os péptidos são ionizados numa fonte de ionização, sendo neste tipo de análise muito utilizada a Fonte de Ionização *electrospray* (ESI), como representado na Figura 6. Desta forma, os péptidos passam através de um capilar, onde são sujeitas a um campo elétrico positivo sendo de seguida pulverizados, originando pequenas gotas altamente

carregadas que são submetidas a um fluxo de gás quente, proporcionando evaporação do solvente e originando desta forma péptidos protonados.

Estes péptidos são injetados no analisador de massa, neste caso um triplo TOF, que irá estes iões e originar uma lista de péptidos (iões precursores) para serem a seguir fragmentados. Assim, um determinado péptido é isolado, fragmentado por colisão com moléculas de um gás inerte e os seus fragmentos são detetados por fim a sua razão massa/carga, originando um espectro de fragmentação (MS / MS) que é de seguida registado.

O método de obtenção dos espectros de fragmentação varia consoante o objetivo da análise, no caso de identificação de proteínas é utilizado o método de Aquisição Dependente de Informação (IDA) onde inicialmente há a seleção dos iões mais intensos de um espectro MS, sendo a seguir obtidos um espectro MS/MS dos iões selecionados. Para a quantificação de proteínas, neste estudo foi utilizado o modo SWATH. Neste método há aquisição de espetros a partir da definição de janelas m/z , ou seja, é selecionado um intervalo de m/z onde todos os péptidos são fragmentados, sendo adquiridos espetros MS/MS que serão a seguir comparados com espetros pré-existentes em bibliotecas obtidas através de IDA.

A utilização de espectrometria de massa tem vindo a tornar-se apelativa em diversas áreas, devido às numerosas vantagens que a técnica disponibiliza. A sua sensibilidade, o elevado rendimento da análise e a sua extensa gama de utilização tem-se mostrado extremamente útil na área da saúde, em aquisição de conhecimento a nível patológico, do diagnóstico, tratamentos. Embora a utilização da espetrometria de massa para análise do LCR está apenas no começo, todas essas características tornam-na muito promissora para o futuro.

2 Objetivos

Objetivos

A DA é uma doença neuronal irreversível e progressiva, que afeta atualmente grande parte da população envelhecida. Embora não se saiba a causa da doença, nos casos esporádicos, esta tem vindo a ser associada aos doentes com DCL, que apresentam um risco acrescido de desenvolver a DA.

Além dos inúmeros progressos no conhecimento dos mecanismos moleculares, o diagnóstico não é preciso e é normalmente tardio, o que acarreta dificuldades no acompanhamento do doente. Torna-se por isso imprescindível, desenvolver novos métodos de diagnóstico, como por exemplo os biomarcadores no LCR, que possibilitem diferenciar a DA com maior precisão, permitam uma deteção na fase pré-assintomática da doença, tornem possível um prognóstico, auxiliem no tratamento e permitam acompanhar a progressão da doença. Desta forma, o uso do LCR tem vindo a ser bastante apelativo em pesquisas para futuros biomarcadores, uma vez que reflete as alterações bioquímicas ocorrentes na patologia, sendo a proteómica uma das técnicas em crescente utilização para este tipo de abordagens.

Posto isto, este estudo tem os seguintes objetivos:

- 1- Avaliar o método de procedimento de amostras para proteómica;
- 2- Estudar o proteoma do LCR de doentes com Alzheimer esporádico e Défice Cognitivo Ligeiro;
- 3- Identificar diferenças no LCR entre doentes com Alzheimer e Défice Cognitivo Ligeiro;
- 4- Identificar possíveis biomarcadores para DA no LCR.

3 Materiais e Métodos

3.1 Amostras

O desenho experimental elaborado para este projeto é constituído por indivíduos de dois grupos patológicos: DCL e DA. O diagnóstico dos indivíduos com DCL teve por base os critérios definidos pelo *MCI Working group of the European Consortium on Alzheimer's disease*. (Portet et al., 2006) Foram desta forma, incluídos no estudo pacientes que apresentavam queixas cognitivas provenientes dos pacientes ou dos seus familiares; comunicação de um declínio do funcionamento cognitivo em relação às habilidades durante o ano anterior; distúrbios cognitivos evidenciados pela avaliação clínica (défice na memória ou noutra domínio cognitivo); ausência de grandes alterações na vida diária, podendo apresentar algumas dificuldades em atividades complexas do dia-a-dia e apresentar ausência de demência.

O grupo de indivíduos com DA foram diagnosticados com base na baixa concentração de βA_{1-42} no LCR e com resultado positivo na tomografia por emissões de protões (PET PiB).

De modo a que não houvesse interferências, em ambos os grupos de estudo foram excluídos indivíduos com presença de outras doenças neurológicas (acidente vascular cerebral, tumores, traumatismos cranianos e epilepsia) e transtorno psiquiátricos que possam induzir a um declínio cognitivo, como grave grau de depressão ou sintomas depressivos severos, com mais de 10 pontos nos 15 da Escala Geriátrica de Depressão; doença sistémica com impacto cerebral (metabólicas, endócrinas, tóxicas ou infecciosas) e histórico de alcoolismo e consumo de drogas.

As amostras de LCR utilizadas são provenientes dos centros clínicos de Coimbra e Lisboa que estão associados ao consórcio de Biomarcadores para doença de Alzheimer e doença de Parkinson (BIOMARKAPD), que tem como objetivo validar biomarcadores no LCR para uso clínico. O projeto BIOMARKAPD foi aprovado pelas comissões de ética de todos os centros clínicos participantes. Foram analisadas amostras de 16 indivíduos com DCL, 9 do sexo feminino e 7 do sexo masculino, com idades entre os 54 e 83 anos. O grupo diagnosticado com DA possuía 14 indivíduos, 9 do sexo feminino e 5 do sexo masculino, com idades entre os 50 e 79 anos.

3.2 Precipitação das proteínas

O primeiro processo necessário para realizar um estudo proteômico é separar a fração proteica dos restantes componentes. Desta forma, para a precipitação das proteínas, foi adicionado 1 µL de padrão interno correspondente a uma proteína recombinante, MalE-GFP (Proteína verde fluorescente) e metanol (LC grade) 1:4 (amostra:metanol). As amostras foram incubadas durante 20 minutos a -80°C, seguindo-se de centrifugação (Centrifuge 5417R, Eppendorf) por 20 minutos a 4°C e 20.000xg.

Após a centrifugação o precipitado foi ressuspensionado em 20 µL de tampão Laemmli¹ [(0,35 M solução de Tris-HCl, com 0,4% SDS (v/v), pH 6,8, 30% glicerol (v/v), 10% SDS (m/v), 9,3% DTT (m/v) e 0,01% Azul de bromofenol (m/v) – concentração de 6x] e posteriormente foi sujeito a sonicação (Modelo do sonicador Vibra Cell 75041 do Bioblock Scientific) em ciclos de 1 segundo (1" sonicação – 1" pausa).

3.3 Testes preliminares

Para realização dos testes preliminares, foi utilizado plasma, uma vez que este é proteicamente semelhante ao LCR e a sua obtenção é de fácil acesso. Sabendo que a concentração proteica no plasma é aproximadamente 100 vezes maior que no LCR, realizou-se uma diluição de 100x do plasma, de forma a poder equiparar os resultados.

De forma a se obter o mesmo volume de LCR, na diluição, foi utilizado 1 µL de plasma para 99 µL de soro (Cloreto de sódio 0,9%, Fluirespira®), que foi seguidamente processado como referido no ponto 3.2

3.3.1 Teste de avaliação da preparação da amostra

De forma a garantir que o processo de preparação das amostras era adequado ao estudo, foram variadas as condições de concentração de tampão de Laemmli e características de

¹ Os componentes presentes no tampão Laemmli têm a seguinte precedência: tris (hidroximetil) aminometano (tris) (Calbiochem®, Merck™), Dodecil sulfato de sódio (SDS) e ditioneitol (DTT) (Biorad), glicerol e azul bromofenol (GE Healthcare) e Cloreto de hidrogênio (HCl) (JT Baker®, Avantor™).

sonicação. Amostras de plasma foram então submetidas a 6 condições, como descritas a seguir, na tabela I.

Tabela I - Diferentes condições de concentração de tampão de Laemmli e características de sonicação, obtendo-se 6 condições de estudo.

Condição	Tampão Laemmli	Sonicação		
		Sonicador	Tempo	Amplitude (%)
1	1x	<i>cup horn</i>	4 min	20
2	1x	<i>cup horn</i>	2 min	40
3	1x	Sonda, 2mm	10 s x2	40
4	2x	<i>cup horn</i>	2 min	20
5	2x	<i>cup horn</i>	2 min	40
6	2x	<i>cup horn</i>	4 min	20

3.3.2 Teste de reprodutibilidade da técnica SWATH-MS

Para avaliar se a técnica utilizada é reprodutível, realizou-se um estudo com três réplicas a partir de uma amostra de plasma diluído. Foram utilizados 100 µL de plasma, onde foi retirado um pequeno volume de cada réplica e foi reunido num tubo de microcentrífuga, para posterior análise. Neste teste a concentração de tampão Laemmli foi de 1x e as amostras sonicadas por 2 min à amplitude de 20%. As amostras foram de seguida processadas como descrito na secção 3.5.

3.4 Estudo LCR

Para estudo do LCR, foi utilizado um volume de 100 µL de cada amostra. Aproximadamente 10 µL extra de cada amostra de DCL e DA foram reunidos num tubo de microcentrífuga, denominado de *pool*.

As condições de precipitação foram as descritas na secção 2.2 e as condições de tampão Laemmli e de sonicação utilizadas foram as descritas na condição 6 da tabela I. Após precipitação das proteínas as amostras foram processadas como descrito na secção 2.5.

3.5 Processamento das amostras

3.5.1 SDS-PAGE (Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio)

Após desnaturação com tampão Laemmli a 95°C por 5 minutos (ThermoMixer® C, Eppendorf), foram adicionados a cada amostra de plasma e LCR 2 µL de acrilamida/ bis-acrilamida (37.5%: 40%, Bio-Rad) de forma a promover a alquilação das cisteínas. As proteínas de cada amostra foram parcialmente separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 4-20% *stain-free* pré-fabricado (Bio-Rad), com utilização do Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System (Bio-rad), a 110V e até a frente de corrida atingir o final do gel no caso do plasma e durante 15 minutos a 110V para as amostras de LCR.

No final, foi observado o perfil de separação por luz ultravioleta (Gel Doc XR , Bio-Rad) (Figura suplementar S.2 e Figura suplementar S.3). Os géis foram de seguida lavados com água destilada e colocados em imersão com uma solução de fixação (10% (v / v) de ácido ortofosfórico (Fisher chemical) (85%), 10% (m/v) de sulfato de amónia (Fisher Chemical), 20% (v / v) de metanol). Foi a seguir corado com pó de *Coomassie Brilliant Blue G-250* (Thermo Scientific), sendo posteriormente submetido a diversas lavagens com água desionizada e mantendo-se em agitação durante toda a noite.

Cada faixa do gel foi de seguida separada e cortada em pequenas bandas com tamanhos semelhantes, e foram transferidos para o poço correspondente numa placa de 96 poços (Deep well block, Ratiolab), sendo adicionado 600 µL de água LC-Grade (Fisher) para evitar que o gel seque. Seguiu-se um processo de descoloração: foi retirada a água e adicionado 600 µL de solução contendo 30% de acetonitrilo (ACN) (VWR) e 50 mM bicarbonato de amónia e colocado a agitar por 15 minutos a 25°C e a rotação de 1050 rpm (ThermoMixer® C, Eppendorf). Após a agitação a solução foi retirada e repetiu-se novamente o processo até os pedaços de gel ficarem incolores, por fim adicionou-se 600 µL de água e foi colocado a agitar novamente durante 10 minutos a 25°C com 1050 rpm's, sendo a seguir retirada e descartada. Os pedaços de gel foram colocados a desidratar sob vácuo a 60°C (Concentrator Plus, Eppendorf). Após o gel estar seco, adicionou-se 75 µL de tripsina (Roche) (0.01 µg/µL em bicarbonato de amónia 10 mM) e foi colocado a 4°C por 10 minutos para reidratar o gel, de seguida, adicionou-se 50 µL de bicarbonato de amónia sendo deixado à temperatura ambiente e sem acesso a luz durante a noite, possibilitando a hidrólise das proteínas.

3.5.2 Extração e purificação dos péptidos

Após a digestão, foi retirado o excesso de tripsina juntamente com alguns péptidos, para um tubo de microcentrífuga de baixa retenção (Eppendorf), neste passo as frações de cada amostra foram novamente reunidas, apenas as referentes ao *pool* foram mantidos em separado

Os péptidos contidos no gel, foram extraídos através da adição de 150 μL de soluções com aumento gradual da concentração de ACN (30%, 50% e 98%) em 1% de Ácido fórmico (AF)(AMRESCO®). Após a adição de cada solução, a placa foi colocada a agitar durante 15 minutos a 25°C e a rotação de 1200 rpm (ThermoMixer® C, Eppendorf), sendo recolhida para um tubo de microcentrífuga que continha os péptidos juntamente com a tripsina. Os tubos foram posteriormente a evaporar a vácuo, a 60°C. De seguida, os péptidos foram ressuspensos em 100 μL de solução com 2% de ACN e 1% de AF e sonicados durante 2 minutos com uma amplitude de 20%.

Após a extração dos péptidos houve necessidade de dessalinizá-los, utilizou-se para isso pontas de pipetas C18 Bond Elut Omix (Agilent) de extração de fase sólida.

O primeiro passo foi hidratar e preparar a fase sólida e para tal utilizou-se 200 μL de 50% de ACN e 300 μL de 2% de ACN com 1% de AF. De seguida os péptidos foram carregados na ponta, o processo foi repetido, no mínimo, 5 vezes. A seguir a ponta foi lavada com 100 μL de solução com 2% de ACN e 1% de AF. Os péptidos foram seguidamente eluídos para um novo tubo de microcentrífuga de baixa retenção com 400 μL de uma solução de 70% de ACN e 0.1% de AF e foram de seguida a evaporar a 60°C.

3.5.3 Preparação dos péptidos para análise LC-MS/MS

Os péptidos foram ressuspensos em 30 μL de uma solução com 2% de ACN e 0,1% de AF, seguidamente foram a sonicar por 2 min a uma amplitude de 40% (ciclos de 1 segundo), seguido de centrifugação (MiniSpin® plus, Eppendorf) por 5 minutos a 14.100xg. O sobrenadante foi por fim transferido para tubos de injetor automático e posteriormente analisados por LC-MS/MS.

3.5.4 Identificação e quantificação de proteínas

As amostras primeiramente sofreram separação por cromatografia líquida (NanoLC Ultra 2D, Eksigent) numa coluna de fase reversa MicroLC, ChromXP™ C18 (300 μ m d.i. x 15 cm L, 3 μ m partículas, poros de 120 Å, Eksigent®) com um fluxo de 5 μ L/min. Os péptidos foram submetidos a um gradiente linear de acetonitrilo com 0,1% de AF de 5 a 10% nos primeiros 2 minutos, de 10 a 30% nos 43 minutos seguintes e nos últimos 2 minutos de 30 até 35%. Para passagem dos péptidos para o espectrómetro de massa, utilizou-se uma fonte de ionização por *electrospray* (DuoSpray™ Source, ABSciex®) em modo positivo.

Para identificação das proteínas foi realizada uma aquisição de dados no modo de Aquisição Dependente de Informação (IDA), sendo analisados apenas 10 μ L das amostras referentes aos *pool*. Para a análise, as especificações do espectrómetro foram definidas de modo a adquirir durante 250 ms um varrimento completo dos iões entre 350-1250 m/z presentes na amostra. Foram selecionados para fragmentação até 100 iões mais intensos, com carga entre +2 e +5 e intensidade acima das 10 contagens por segundo (cps, do inglês *counts per second*). Para cada ião selecionado o respetivo espectro de fragmentação foi adquirido com tempo de acumulação variável (com um mínimo de 30 ms de acumulação para precursores com intensidade superior a 1000 cps) de modo a obter um ciclo de 3.3. s.

As restantes amostras foram analisadas para quantificação de proteínas, realizada no modo SWATH. As condições de cromatografia líquida utilizadas foram idênticas às descritas anteriormente.

As especificações do espectrómetro de massa foram alteradas de modo a obter um conjunto de 60 janelas cíclicas de fragmentação (Tabela suplementar S.1) de modo a cobrir por completo todos os iões num intervalo de massas de 350-1250 m/z. No início de cada ciclo foi adquirido um espectro de massas (entre os 350-1500 m/z) por 250 ms para calibração do instrumento. Os espectros SWATH-MS/MS foram adquiridos para fragmentos entre 100-1500 m/z com um tempo de acumulação de 50 ms, obtendo um ciclo de 3,25 s. A energia de colisão para cada janela foi definida consoante o valor necessário para fragmentar um ião de carga +2 do centro da janela com uma variação de energia de colisão ajustada à janela.

3.6 Análise de dados

O perfil das proteínas obtido através da análise dos géis de acrilamida por luz ultravioleta, foram analisados, calculando a intensidade total da amostra. Esta análise foi realizada através do programa Image Lab (v5.1, Bio-Rad).

A identificação das proteínas e a criação da biblioteca, foi realizada a partir das amostras referentes aos *pool* das duas patologias. Os dados obtidos por IDA, foram analisados no programa ProteinPilot (v5.1, ABSciex) com os seguintes critérios: Pesquisa contra a base de dados *Homo Sapiens* da SwissProt (revista em Maio de 2016) e MaIE-GFP, modificações determinadas por alquilação das cisteínas pela acrilamida e tripsina como enzima de digestão. A análise da taxa de falsa deteção (FDR) foi utilizada uma abordagem de *target-decoy* a partir do programa ProteinPilot, permitindo verificar que a identificação é positiva e de qualidade se se obtiver um grau de confiança para as proteínas e para os péptidos de 95% (FDR local de 5%).

Utilizando o programa ProteinPilot com os mesmos parâmetros de pesquisa descritos a cima, todos os ficheiros originados através do IDA foram utilizados para criar uma biblioteca específica dos fragmentos de iões e das massas precursoras. O processamento para a análise quantitativa das amostras foi realizado utilizando o *plug-in* de processamento SWATH™ para o PeakView™ (v2.0.01, ABSciex). Desta forma, os péptidos foram automaticamente selecionados a partir desta biblioteca cumprindo os seguintes critérios: exclusão de péptidos com modificações variáveis e manter as modificações fixas e excluir péptidos partilhados entre proteínas. Foram escolhidos a partir da biblioteca criada no máximo 15 péptidos por proteína, identificadas com FDR local abaixo dos 5%, correspondente a 307 proteínas.

Na análise dos dados obtidos através do método SWATH, os péptidos são confirmados após serem selecionados um conjunto de iões, com até 5 fragmentos selecionados automaticamente, sendo os tempos de retenção alinhados a partir do padrão interno (MaIE-GFP). A confiança do péptido para cada proteína foi determinada a partir de uma análise FDR com abordagem *target-decoy* e um limite de confiança de 1%.

As áreas dos fragmentos dos iões selecionados foram extraídas através de ensaios de cromatograma de extração de ião (XIC), com janelas de 3 minutos e um erro associado de 100 ppm.

Os péptidos extraídos que atingiram o limite de 1% do FDR em pelo menos metade das amostras de cada grupo de estudo foram mantidos. Para obtenção dos níveis das proteínas,

foram somadas a intensidade de todas as transições por péptidos e todos os péptidos para cada proteína, sendo a seguir normalizadas pela intensidade total de todas proteínas.

A análise de *outliers* foi realizada com auxílio do programa GraphPad PRISM® v6.01, utilizando método *ROUT*. Foi realizado um teste de normalidade, porém, como muitas proteínas não passaram neste teste de normalidade, optou-se por utilizar o teste não-paramétrico Mann Whitney, com auxílio do programa informático Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, v22). Os resultados que obtiveram valor de $p \leq 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes e foram mantidos para análise posterior.

3.7 Seleção das proteínas de interesse

Para selecionar as proteínas de interesse, foi necessária uma análise mais focada das proteínas identificadas e quantificadas anteriormente. Para esse estudo foram utilizados diferentes programas e diferentes métodos de análise.

De forma a comparar o número de proteínas entre amostras foi utilizado o diagrama de Venn, através do aplicativo *BioVenn application* (<http://www.cmbi.ru.nl/cdd/biovenn/>) que torna a visualização das diferenças fáceis de serem identificadas. Foi desta forma, utilizado para comparar as proteínas identificadas no LCR de DA Vs. DCL, e nas proteínas quantificadas com valor de $p < 0,05$ no grupo DA Vs. DCL, só para o género feminino e só para o género masculino.

A partir do número de identificação de cada proteína e com auxílio da página UniProt (<http://www.uniprot.org/>), foi possível identificar e obter informação acerca de cada proteína.

Foi realizada uma análise de componentes principais (PCA), utilizada para visualizar a separação entre os grupos em estudos e por sua vez, as proteínas de maior relevância nessa separação. Para esta análise foi utilizado o programa MarkerView™ (v1.2.1.1), sendo a análise efetuada com base no princípio de Pareto.

4 Resultados e Discussão

4.1 Testes preliminares

4.1.1 Teste de avaliação da preparação da amostra

Para a realização do estudo, foi necessário definir as condições iniciais de preparação das amostras. Nesse primeiro estudo, utilizaram-se amostras de plasma devido à sua semelhança proteica com o LCR, sendo realizadas diferentes condições de sonicação e concentração de tampão Laemmli (ver Materiais e Métodos 3.2.1). A partir da análise do perfil das amostras no gel (figura 7), concluiu-se que a condição que melhor resultado apresenta, é a condição 6.

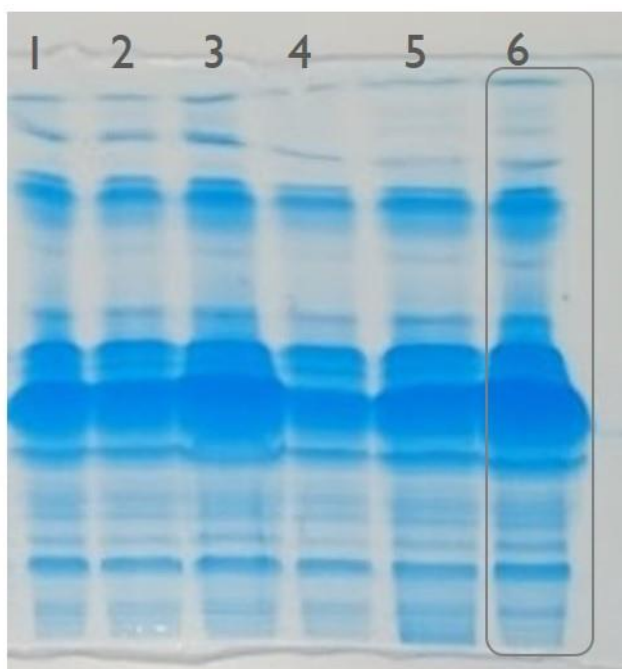


Figura 7 – Análise do perfil das proteínas no gel de poliacrilamida nas 6 condições estudadas.

Verifica-se que todos os perfis são muito semelhantes, concluindo que o procedimento resultou para todas as condições estudadas, embora na condição 4 (Tampão Laemmli 2x e sonicação a 20% por 2 min) aparenta levar a uma menor recuperação de amostra. É possível ainda observar que para a condição 6, as bandas são maiores e com mais intensidade, indicando que está presente uma quantidade maior de proteína e uma melhor separação das mesmas, sendo por esse motivo o método escolhido para utilização nas amostras de LCR.

4.1.2 Teste de reprodutibilidade do procedimento

De forma a garantir que todo o processo para identificação e quantificação das proteínas é reprodutível, foram analisadas 3 réplicas de plasma (ver Materiais e Métodos 3.3.2). A quantificação relativa resultante do processamento dos dados foi comparada entre as réplicas e representada graficamente para melhor visualização, como se pode observar na figura 8. Nesta representação não estão presentes os valores referentes a Albumina, devido ao facto de apresentar níveis muito maiores em relação às outras proteínas, fazendo com que não seja possível ter uma visualização clara dos restantes valores, como é possível observar na Figura suplementar S.1.

Após realização da comparação entre as réplicas, pode-se concluir que o método utilizado é indicado para este tipo de análise, uma vez que, obteve valores de $r^2 > 0.9$ e através das equações das retas, observa-se que os declives são próximos de 1, indicando que existe uma correlação linear entre todas as amostras.

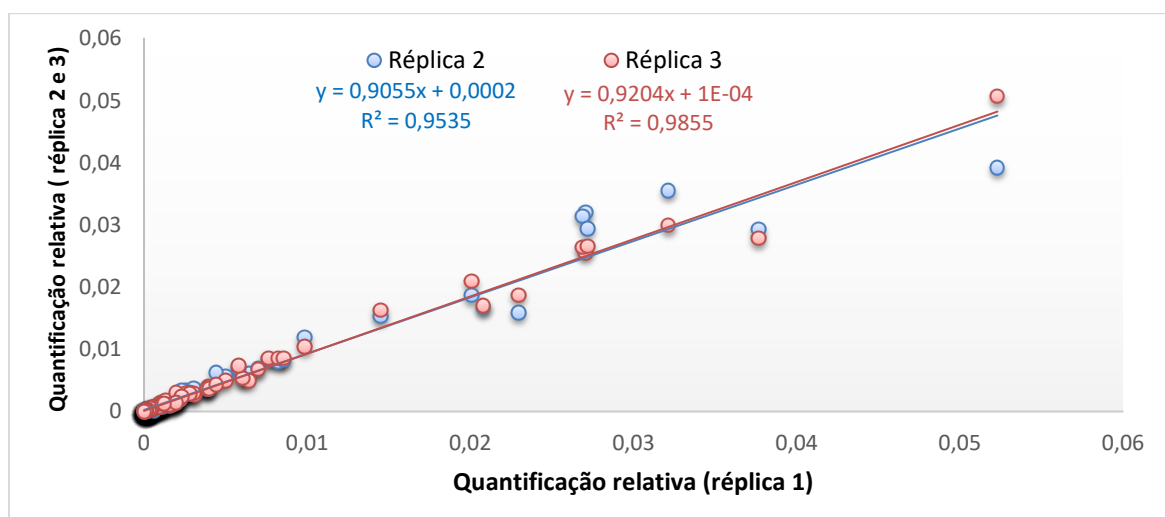


Figura 8 – Gráfico representativo da relação entre cada amostra. As linhas de tendência mostram uma relação linear entre as amostras, e os seus respetivos coeficientes de correlação com valores acima dos 0.9 demonstram que o processo utilizado é adequado para este tipo de análise. Para a realização deste gráfico foi retirado o valor referente à albumina, uma vez que é uma proteína extremamente abundante e o seu valor muito superior aos restantes.

4.2 Estudo proteómico do LCR

De forma a identificar possíveis biomarcadores para a DA, foi realizado um estudo para observar as diferenças existentes entre as duas patologias estudadas. Foram também estudadas diferenças que podem ocorrer na patologia de Alzheimer influenciadas pela diferença de géneros.

4.2.1 DLC Vs. DA

Para observar o número de proteínas únicas para cada condição e se a quantidade de proteínas identificadas pelo método IDA (ver Materiais e Métodos 2.4.4) eram semelhantes em ambas as patologias, utilizou-se o diagrama de Venn que está representado na Figura 9. Através desta análise pode-se verificar que para a patologia de DCL o número de proteínas identificadas é o dobro que para a DA, conseqüentemente o número de proteínas únicas para DCL é também bastante elevado.

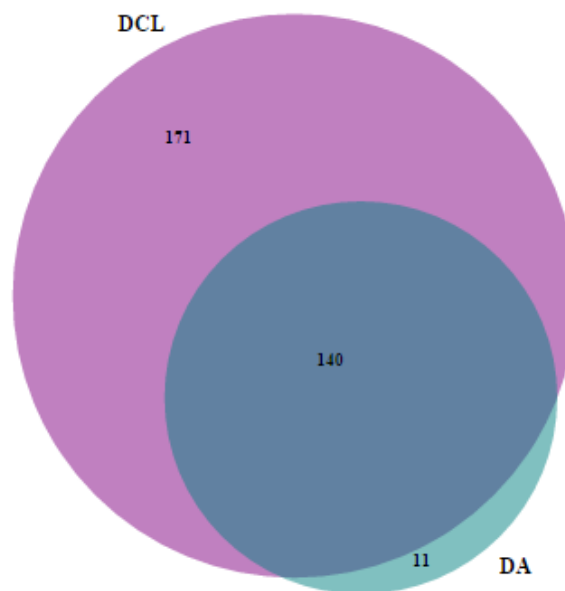


Figura 9 – Diagrama de Venn para as proteínas identificadas nas amostras de DA e DCL. No diagrama está representado o número de proteínas identificadas compartilhadas e únicas entre as patologias.

Esta diferença acentuada pode ser explicada por diversos fatores técnicos, embora muito provavelmente se tenha devido principalmente ao facto de na fração referente ao *pool* de DA haver uma quantidade de proteínas muito inferior ao *pool* do DCL como se pode observar na Figura suplementar S.2. Pode ser interessante ser estudado futuramente para perceber se esta diferença quantitativa terá sido derivada de algum problema técnico e/ou se efetivamente existe uma menor concentração de proteína total no LCR de doentes de DA.

4.2.2 Seleção das proteínas de interesse

Após a realização da análise dos dados (ver Materiais e Métodos 3.5.4), as proteínas quantificadas em ambas as patologias, foram sujeitas a estudos de análise estatística (ver Materiais e Métodos 3.6) para determinação do valor-p da comparação de cada proteína. De forma a visualizar e selecionar algumas proteínas de interesse, os dados foram representados num gráfico *Volcano*, onde é possível observar as proteínas com menor valor-p e maior variação entre os dois grupos. As proteínas que apresentam uma diminuição de duas vezes entre DA e DCL, foram selecionadas e estão representadas a branco com a respetiva identificação (figura 10).

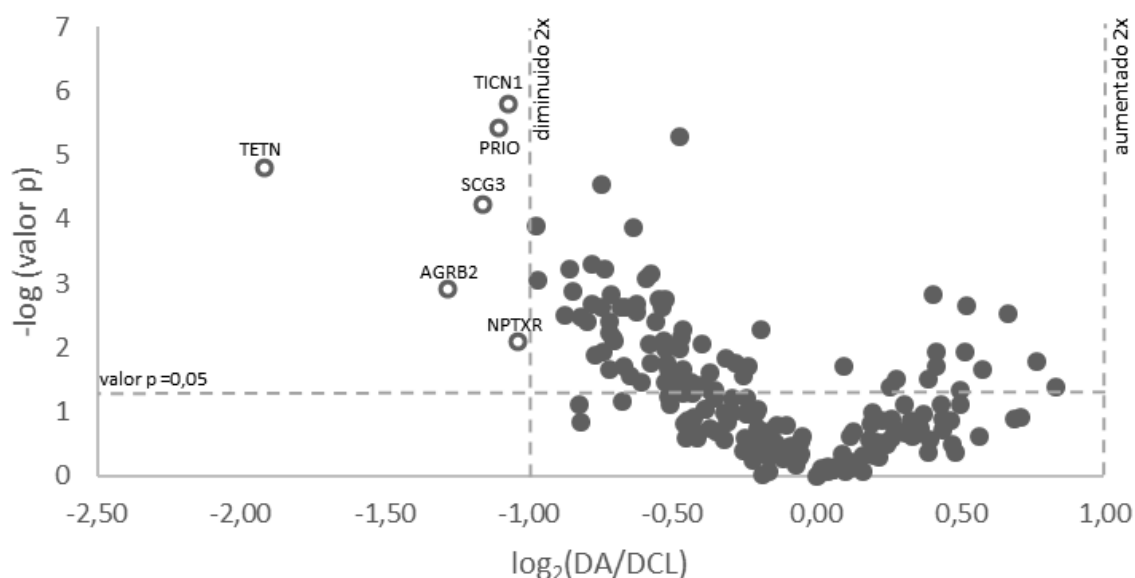


Figura 10 – Representação gráfica das proteínas alteradas. Estão representadas as todas proteínas identificadas com confiança e normalizadas para a intensidade total. As linhas verticais marcam o ponto a partir do qual a variação é 2x superior e 2x inferior na DA em relação ao DCL. A linha horizontal marca o ponto onde o valor p é igual a 0,05. Os critérios de seleção das proteínas foram: maior valor de variação e menor valor-p, estas estão assinaladas a branco com a respetiva identificação

É possível observar que não foram identificadas proteínas 2x aumentadas na DA em relação a DCL. As proteínas selecionadas como sendo de interesse estão representadas na Tabela 2.

Foram também selecionadas todas as proteínas que apresentaram um valor-p inferiores a 10^{-3} , uma vez que, quanto menor for o valor de p maior será a significância estatística, sendo neste caso muito perto da máxima.

Tabela 2 - Identificação das proteínas de interesse selecionadas através do gráfico *Volcano* e com p menor a 0.001. Estão representadas as identificações das proteínas e os seus respetivos números de acesso.

Número de identificação	Proteína	Varição (DA/DCL)
<i>P05452</i>	TETN - Tetranectina	0,26
<i>Q8WXD2</i>	SCG3 - Secretogranina III	0,45
<i>P04156</i>	PRI0 - Príon	0,47
<i>Q08629</i>	TICNI - Testican I	0,48
<i>O60241</i>	ADGRB2 - Proteína de Adesão G, acoplada ao recetor B2	0,41
<i>3095502</i>	NPTXR - Recetor neuronal Pentraxin	0,49
<i>P61769</i>	B2MG - β -2 microglobulina	0,51
<i>O14498</i>	ISLR - Superfamília de imunoglobulina com repetições ricas em leucina	0,60
<i>P24592</i>	IBP6 - Proteína 6 de Ligação a Fator de Crescimento Semelhante à Insulina	0,64
<i>Q9GZM8</i>	NDELI - Proteína de distribuição nuclear nudE, tipo I	0,72

Como as duas formas para identificar proteínas alteradas utilizadas anteriormente têm por base o seu valor estatístico, torna-se uma seleção muito restritiva, sendo por esse motivo necessário recorrer a outro método de seleção de forma a abranger outras variáveis. Desta forma foi realizado o método de análise de componentes principais (ver Materiais e Métodos 3.7), para os valores correspondentes a todas proteínas com valor de $p < 0,05$. O resultado desta análise está representado na Figura 11.

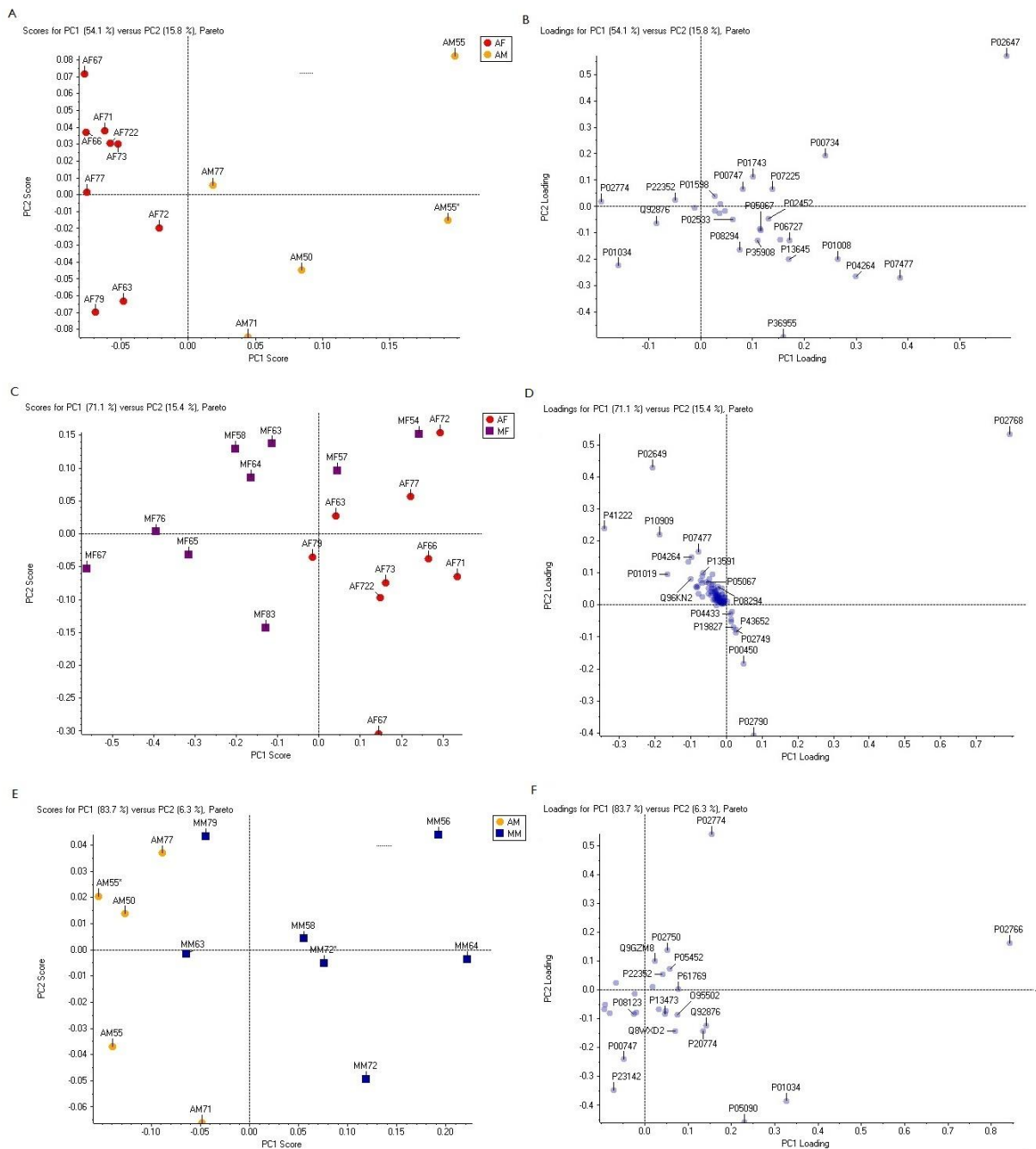


Figura 12 - Análise de componentes principais. A- Este grupo é referente a comparação entre feminino (vermelho) e masculino (amarelo) com DA. A Percentagem do peso da componente PC1 e da componente PC2 é de 54,1% e 15,8, respectivamente. B- Representação das respectivas proteínas utilizadas para análise em A. C- Está representado neste grupo a comparação entre o gênero feminino das amostras de DA (vermelho) e DCL (roxo). A percentagem diferencial das componentes PC1 e PC2 é de 71,1% e 15,4, respectivamente. D- Proteínas utilizadas para análise em C. E- Este painel representa a comparação entre o gênero masculino das amostras de DA(amarelo) e DCL (azul), com uma percentagem diferencial de 83.7% para a componente PC1 6,3 para a componente PC2. F- Respetivas proteínas utilizadas para análise em E. Cada ponto esta identificado de acordo com a patologia, o gênero e a idade.

A partir da análise da figura 12 é possível observar que todos os grupos têm uma elevada componente diferencial. Na imagem referente às amostras de DA (Figura 12, A) é possível observar que existe uma separação entre os gêneros bem definida, pela principal componente de análise PC1, o que nos indica que este pode ser um fator diferencial na DA. A partir da representação das proteínas de separação (Figura 12, B) foram selecionadas as que

40| Resultados e Discussão

apresentavam valores mais distantes e foi analisado o perfil de cada proteína, de modo, a observar se há realmente uma diferença entre as amostras. Todos os perfis estão representados em anexo na Figura suplementar S.5 a Figura suplementar S.8

Na comparação entre masculino e feminino das amostras com DA, os perfis das proteínas Protrombina e Apolipoproteína A I, representados na Figura 13, demonstram uma alteração mais acentuada nos indivíduos masculinos com idades entre os 50 e 55 anos. Embora não seja conclusivo, esta alteração pode indicar uma possível relação com a idade, possivelmente quando a doença começa muito precocemente, uma vez que foi observada nos indivíduos mais jovens e em ambas proteínas. Porém torna-se necessário um estudo mais abrangente, com uma amostra populacional maior a fim de validar esta informação.

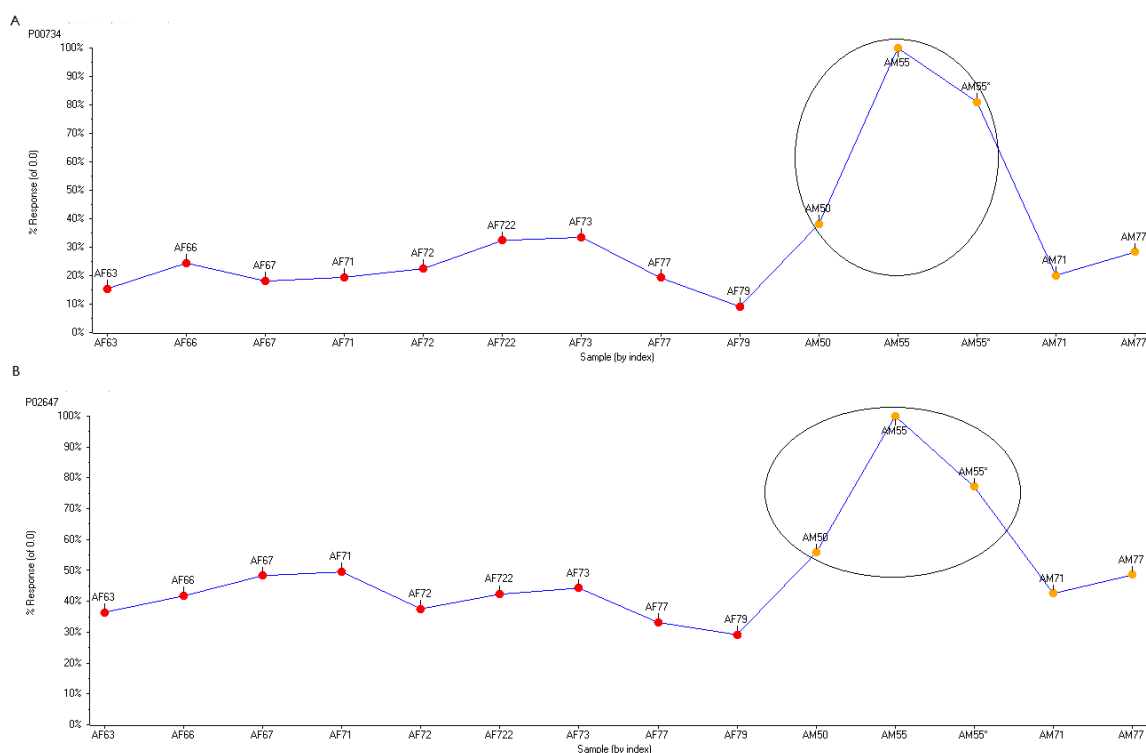


Figura 13 -Análise do perfil das proteínas Protrombina e Apolipoproteína I nas amostras de DA. A- Representação do perfil da proteína (Protrombina (P00734)). B- Representação do perfil da proteína Apolipoproteína A I (P02647). Ambas representações são referentes ao perfil das proteínas em todas amostras com DA e encontra-se assinalado com um círculo os indivíduos que apresentaram alteração.

Foram selecionadas com base na análise de PCA um total de 13 proteínas, que estão representadas na tabela 3, com a indicação do grupo de comparação.

Tabela 3 - Proteínas identificadas por análise PCA. As proteínas descritas foram selecionadas após análise do seu perfil (ver Anexo 7.4).

Grupo de comparação	Número de identificação	Proteína	Varição
Alzheimer (Feminino vs. Masculino)	P00734	THRB - Protrombina	0,40
	P02647	APOA1 – Apolipoproteína A I	0,62
	P04264	K2C1 – Queratina tipo 2, citoesqueleto I	0,49
	Q92876	KLK6 – Caliceína 6	1,63
Feminino (DA vs. DCL)	P02790	HEMO - Hemopexina	1,48
	P02649	APOE – Apolipoproteína E	0,59
Masculino (DA vs. DCL)	P01034	CYTC – Cistatina C	0,36
	P01743	HVI46 - Imunoglobulina variável I-46	2,08
	P01860	IGHG3 - região Ig cadeia gama-3 C	4,30
	P02766	TTHY - Transtirretina	0,40
	P05090	APOD – Apolipoproteína D	0,57
	P23142	FBLN1 – Fibulina I	1,49
	P02452	CO1A1 - Cadeia de colagénio α -I tipo I	1,98

Foi ainda realizado um estudo para identificar as proteínas alteradas comuns aos grupos de estudo comparados com DCL. Para esta análise, foram utilizadas para cada grupo todas as proteínas com valores de $p < 0,05$ apresentadas num diagrama de Venn, de forma a obter-se uma visualização simples das proteínas de interesse (Figura 14).

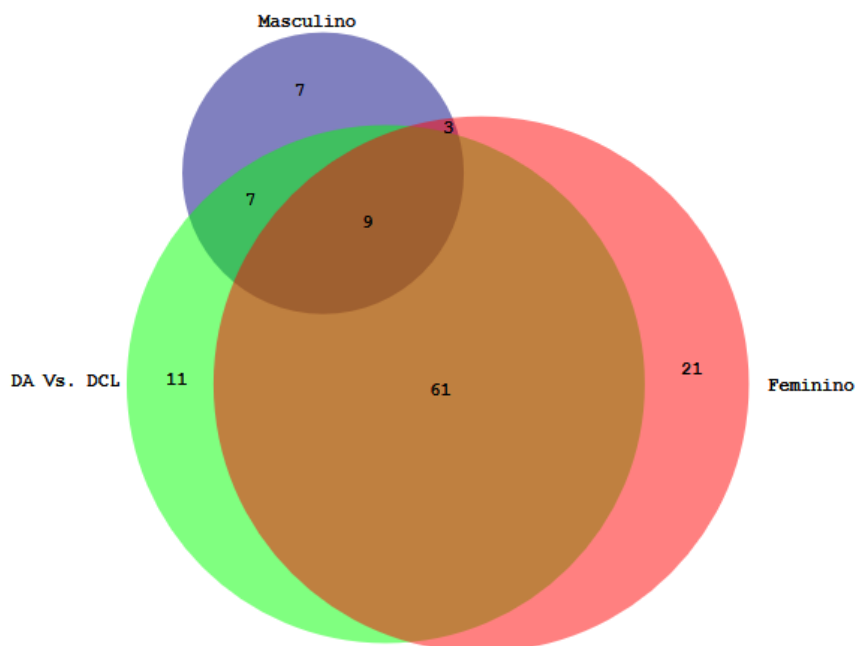


Figura 14 – Representação de todas proteínas alteradas em três grupos de estudo. Da vs. DCL, representa a comparação de todas amostras de DA em relação ao DCL. O grupo Feminino compara as amostras de indivíduos do sexo feminino com DA em relação ao DCL. O grupo Masculino é referente à comparação das amostras de indivíduos do sexo masculino com DA em relação ao DCL. Só foram utilizadas proteínas com valor de p inferior a 0,05.

A partir da visualização do diagrama de Venn, é possível observar uma diferença no número de proteínas alteradas entre o grupo feminino e masculino, podendo ser uma indicação da diferença entre os géneros. Foram identificadas 9 proteínas alteradas comuns aos três grupos em estudos que estão indicadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Identificação de proteínas alterados comuns entre os 3 grupos em estudo. Recorreu-se a utilização de um diagrama de Venn, para melhor visualização e identificação das proteínas alteradas.

Número de identificação	Proteína	Variação (DA/DCL)
Q8WXD2	SCG3	0,45
P04156	PRI0	0,47
P05452	TETN	0,26
P61769	B2MG	0,51
O14498	ISLR	0,60
Q9GZM8	NDELI	0,72
P20774	MIME - Mimecan	0,61
P13473	LAMP2 - glicoproteínas de membrana associada ao lisossoma 2	0,68
Q96S96	PEBP4 - Proteína de ligação a fosfatidiletanolamina 4	0,69

Como um dos objetivos deste estudo é estudar a relação proteica entre a DA e DCL, com base nas proteínas alteradas significativamente que são comuns nos 3 grupos comparados,

foi realizado um *box-plot* para cada proteína, de forma a analisar essa alteração. Os valores utilizados foram correspondentes a todas as amostras, comparando assim a alteração entre a DA e DCL, como está representado na Figura 15.

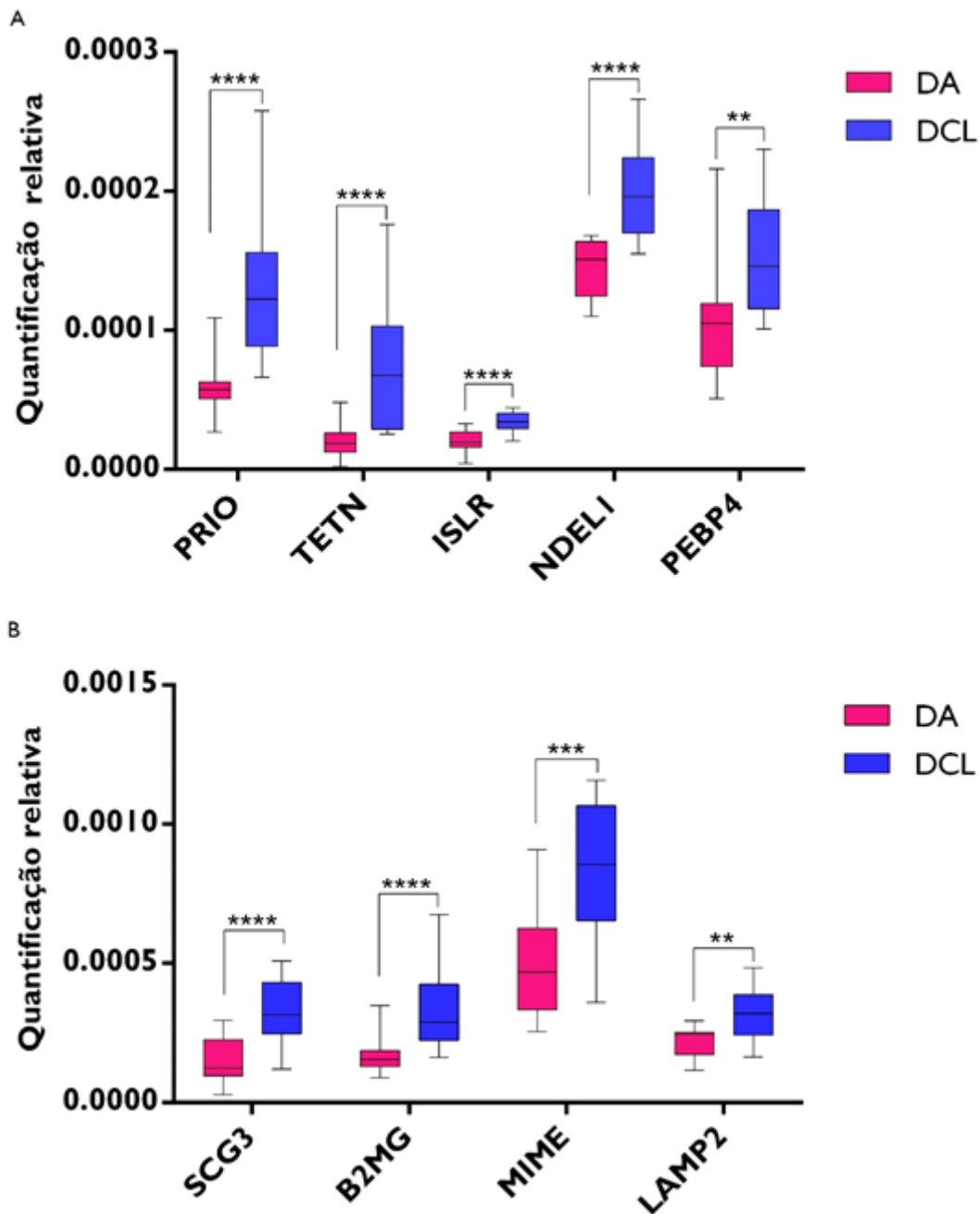


Figura 15 – Variação quantitativa de cada proteína em ambas as patologias. A – Análise das proteínas com menor concentração relativa. B – Análise das proteínas com maior concentração relativa. Está representada a dispersão dos valores. ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ e **** $p \leq 0,0001$ representam a significância da comparação entre as patologias estudadas, pelo teste não-paramétrico Mann Whitney.

Após análise comparativa da quantificação relativa das proteínas nas amostras de DA e DCL, que estão alteradas nos 3 grupos em estudo, observa-se que em todos os casos as proteínas estão diminuídas na DA. Embora todas as proteínas representadas apresentem um resultado interessante, é de salientar as proteínas PRIO, TETN e B2MG, onde se observa

pouca variabilidade entre os indivíduos com DA e diminuição em relação a DCL mais acentuada.

4.2.3 Estudo das proteínas selecionadas

Após seleção das proteínas de interesse pelos diferentes critérios/métodos, optou-se por retirar a proteína Queratina tipo 2, citoesqueleto I (K2C1), uma vez que o processo de preparação da amostra é extremamente sensível, o risco de contaminação com esta proteína é elevado, também pode ocorrer contaminação aquando da punção lombar.

Todas as outras proteínas foram organizadas na Tabela 5, onde está discriminada a variação e o valor-p para cada grupo de comparação, esta dinâmica ajuda numa análise rápida para cada proteína e relacionando-a nos diferentes grupos.

Tabela 5 - Proteínas de interesse e respetivas variações e valor-p para os diferentes grupos de comparação. 1- Identificadas através do gráfico *Volcano*; 2- Identificadas por valor-p <10⁻³, no grupo de comparação DA Vs. DCL; 3- Identificadas por análise PCA; 4- Identificadas através do diagrama de Venn, todas as proteínas que são comuns entre os grupos DA Vs. DCL, Feminino e Masculino. Estão em material suplementar as tabelas referentes aos valores de cada amostra, variação e valor-p referente a cada grupo em estudo (Tabela suplementar S3, S4, S5 e S6).

Número de identificação	Proteína	Grupo de comparação							
		DA Vs. DCL		DA (feminino Vs, Masculino)		Feminino (DA Vs, DCL)		Masculino (DA Vs, DCL)	
		variação	valor-p	variação	valor-p	variação	valor-p	variação	valor-p
P05452	TETN ^{1,2,4}	0,26	0,00002	–	–	0,36	0,00800	0,13	0,00300
Q8WXD2	SCG3 ^{1,2,4}	0,45	0,00006	–	–	0,43	0,00100	0,48	0,04800
P04156	PRI0 ^{1,2,4}	0,47	3,74E-06	–	–	0,51	0,00100	0,41	0,00500
Q08629	TICN1 ^{1,2}	0,48	1,60E-06	–	–	0,50	0,00100	–	–
O60241	ADGRB2 ¹	0,41	0,00100	–	–	0,44	0,00600	–	–
O95502	NPTXR ¹	0,49	0,00800	–	–	–	–	0,35	0,03000
P61769	B2MG ^{2,4}	0,51	0,00013	–	–	0,59	0,01100	0,43	0,00300
O14498	ISLR ^{2,4}	0,60	0,00003	1,60	0,042	0,69	0,00400	0,43	0,00500
P24592	IBP6 ²	0,64	0,00013	–	–	0,66	0,00100	–	–
Q9GZM8	NDELI ^{2,4}	0,72	0,00001	–	–	0,77	0,00100	0,66	0,01000
Q92876	KLK6 ³	0,61	0,00700	1,63	0,042	–	–	0,41	0,01000
P02790	HEMO ³	1,21	0,03100	–	–	1,48	0,01100	–	–
P01034	CYTC ³	0,58	0,00400	1,71	0,042	–	–	0,36	0,01000
P01743	HVI46 ³	1,49	0,02200	0,54	0,019	–	–	2,08	0,01000
P02766	TTHY ³	0,60	0,00100	–	–	–	–	0,40	0,01800
P05090	APOD ³	0,65	0,00300	–	–	–	–	0,57	0,01800
P20774	MIME ⁴	0,61	0,00100	–	–	0,68	0,03100	0,50	0,04800
P13473	LAMP2 ⁴	0,68	0,00200	–	–	0,65	0,01400	0,72	0,04800
Q96S96	PEBP4 ⁴	0,69	0,00200	–	–	0,72	0,04000	0,63	0,04800
P00734	THRB ³	–	–	0,40	0,029	–	–	–	–
P02647	APOAI ³	–	–	0,62	0,012	–	–	–	–
P01860	IGHG3 ³	–	–	0,26	0,007	–	–	4,30	0,01000
P23142	FBLNI ³	–	–	–	–	–	–	1,49	0,03000
P02649	APOE ³	–	–	–	–	0,59	0,00300	–	–
P02452	COIAI ³	–	–	0,36	0,007	0,60	0,00600	1,98	0,03000

É de salientar o facto de que as proteínas APOAI e THRB, representadas anteriormente na Figura 13, apenas estão alteradas no grupo da DA nos indivíduos com 50 e 55 anos. Estudos indicam que a proteína Apolipoproteína AI possa estar envolvida no processo de prevenção da neurotoxicidade causada aquando a agregação dos péptidos β A. (Paula-Lima et al., 2009) Por outro lado, a proteína Protrombina, está relacionada a indução do processo inflamatório a partir da ativação da microglia, iniciando uma resposta inflamatória mediada por citocinas inflamatórias. (Selkoe, 2001) (Suo, Citron and Festoff, 2004) (Arai et al., 2006)

Outras proteínas que se podem destacar são a IGHG3 que está aumentada nos doentes masculinos com Alzheimer e a FBLN1 que está alterada apenas na comparação entre os grupos masculinos das duas patologias. A proteína IGHG3 é uma proteína associada ao sistema imunitário, podendo estar desta forma associada ao processo inflamatório. (Huck et al., 1986) A proteína FBLN1, estará possivelmente envolvida na modulação da atividade neurotrófica da APP, particularmente no fragmento sAPP que está associado a atividades neuroprotetoras. (Ohsawa, Takamura and Kohsaka, 2001) Estas alterações podem indicar uma possível diferença entre os géneros.

Verifica-se uma diminuição na proteína ApoE, que vai de encontro ao encontrado em outros estudos (Korolainen et al., 2010). Embora neste estudo apenas tenha apresentado alteração no género feminino DA Vs. DCL, o que parece ser coerente com alguns artigos. Esta proteína já está solidamente associada como um fator de risco para a DA, porém alguns estudos têm vindo a demonstrar uma alteração mais significativa no sexo feminino, com uma maior probabilidade de desenvolver a doença. (Altmann et al., 2014) (Sampedro et al., 2015)

A proteína CO1A1, apresenta-se alterada apenas nas comparações realizadas entre os géneros, podendo ser um indicador para a diferença entre estes. A CO1A1 está associada a várias proteínas, exercendo uma função protetora na recuperação de lesões cerebrais. (Kelly et al., 2016) (Soderblom et al., 2013) É possível observar que esta proteína se encontra aumentada significativamente no género masculino, podendo significar um aumento nos processos de neuroreparação mais acentuada no género masculino com DA.

Visto que um dos objetivos deste estudo é estudar as diferenças proteómicas entre doentes de DA e doentes com DCL, foi realizado um estudo para cada proteína alterada na comparação DA Vs. DCL e identificada a sua relação com a DA (Tabela Suplementar 8.2).

Após este estudo, foi possível organizar graficamente as proteínas consoante a sua possível influência na DA, possibilitando assim, observar o seu interesse como biomarcador.

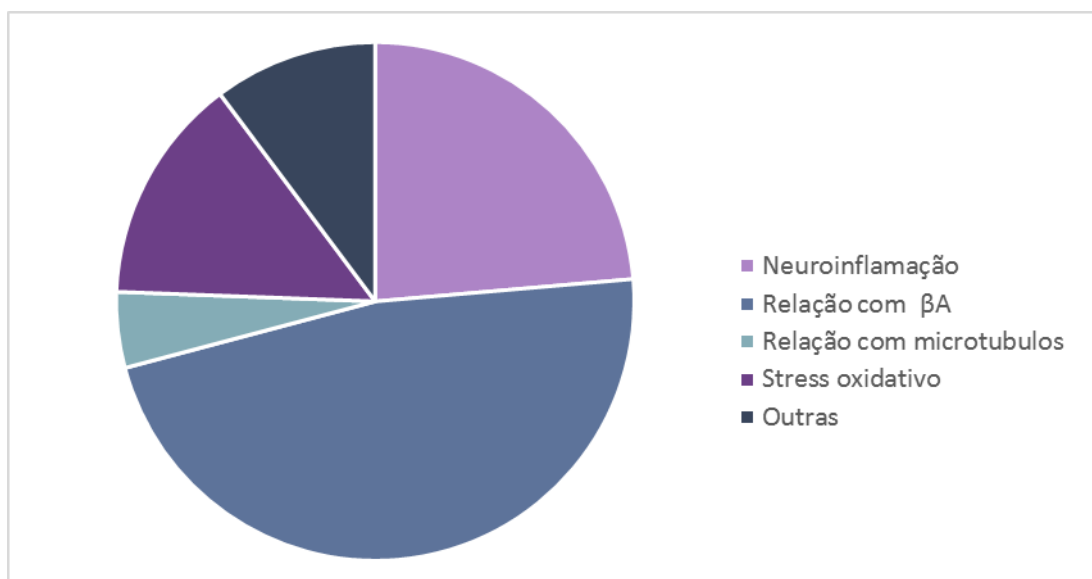


Figura 16 - Representação gráfica da distribuição das proteínas em relação a sua possível função de interação com a DA. Este gráfico foi obtido a partir da Tabela Suplementar 8.2 onde está discriminada cada proteína e sua respectiva relação com a DA.

Como é possível observar na Figura 16, a maioria das proteínas identificadas estão relacionadas com os péptidos de β A. As proteínas relacionadas como mecanismos de proteção são a TENT, CYTC, TICNI, TTHY e LAMP2, que possuem funções de prevenção da neurotoxicidade, por meio da ligação à ApoAI (TENT) e por ligação direta aos péptidos de β A (CYTC, TTHY). As proteínas SCG3 e PRIO, são afetadas pelos péptidos de β A levando a processos de neurodegeneração e as proteínas B2MG e KLK6 estão envolvidas em processos que estimulam a produção dos péptidos de β A. Salienta-se o facto de que todas as proteínas relacionadas com os péptidos de β A se encontram diminuídas na DA, o que pode indicar não uma relação com a patologia, mas sim pelo facto estarem agregadas às placas amiloides.

As proteínas IBP6 e TTHY têm capacidades pró-inflamatórias e estão ambas diminuídas, corroborado por outros artigos. (Ribeiro et al., 2012) (Chesik et al., 2004) (Korolainen et al., 2010) As proteínas HVI46, HEMO e APOD são anti-inflamatórias, estando as duas primeiras aumentadas e a APOD diminuída. (Dassati, Waldner and Schweigreiter, 2014) Embora por mecanismos distintos estão todas relacionadas com o processo inflamatório que é desencadeado no início da agregação dos péptidos de β A de forma a combatê-los, alguns estudos indicam que processos inflamatórios podem por outro lado estar na causa da doença. (Chakrabarti et al., 2015) (Selkoe, 2001).

Foram identificadas 3 proteínas ligadas ao stress oxidativo, APOD, MIME e HEMO. Todas estas proteínas são antioxidantes, encontram-se as duas primeiras diminuídas e a HEMO aumentada. Embora esta proteína tenha sido encontrada em outro estudo também aumentada, a APOD também seria de esperar que estivesse aumentada. (Dassati, Waldner and

Schweigreiter, 2014) (Ringman et al., 2012) Este mecanismo já foi apresentado em diversos estudos como sendo um possível fator que contribui para o desenvolvimento da doença. A produção de radicais livres através de processos de oxidação dos íons de ferro, alumínio e mercúrio, diminuição do metabolismo energético e eventos excitotóxicos, são os principais mecanismos capazes de desencadear o stress oxidativo. (Markesbery, 1997)

Foi identificada uma proteína relacionada com os microtúbulos, NDELI que se apresenta diminuída. Sabe-se que esta proteína é regulada pela proteína Cdk5 (relacionada com processos de neurodegeneração na DA) no crescimento de neurites e é ativa na regulação dos microtúbulos. A sua diminuição pode estar relacionada com a desagregação dos microtúbulos e consequentemente formação das tranças neurofibrilares de Tau. (Bradshaw and Hayashi, 2016) (Liu et al., 2016)

Foram identificadas outras proteínas como a ADGRB2 (diminuída), que embora não se saiba os mecanismos exatos no qual ela está relacionada, estudos indicam que a sua diminuição irá levar ao aumento da expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), associado a um efeito neuroprotetor na presença das placas amiloides das tranças neurofibrilares de Tau. (Hohman et al., 2015) (Kee et al., 2002) (Duman, Tu and Tolia, 2016)

Outra proteína selecionada foi a ISLR (diminuída), sabe-se que é uma proteína de adesão celular e possui homologia a diversas proteínas, já tendo sido relacionada a alguns recetores de neurotrofina (p75 ou TROY) e que permite a formação de um complexo responsável por inibir a regeneração dos axónios. (Sollner and Wright, 2009)

A proteína NPTXR, está associada a regulação na neurotransmissão do glutamato em neurónios excitatórios. Uma vez que ela apresenta estar diminuída nos doentes com Alzheimer, pode-se sugerir uma relação com as placas amiloides, uma vez que ocorre perda sináptica após a aglomeração dos péptidos de β A. (Bilousova et al., 2015)

A proteína PEBP4 (diminuída), está relacionada com a regulação das vias MAPK, interage com as proteínas Raf-1 e MEK1 e é capaz de inibir a indução da apoptose através do TNF α ou TRAIL. (He et al., 2016)

A seguir realizou-se um estudo por PCA das proteínas alteradas no grupo DA vs. DCL, de forma a tentar perceber se as proteínas selecionadas são capazes de diferenciar os dois grupos (Figura 17).

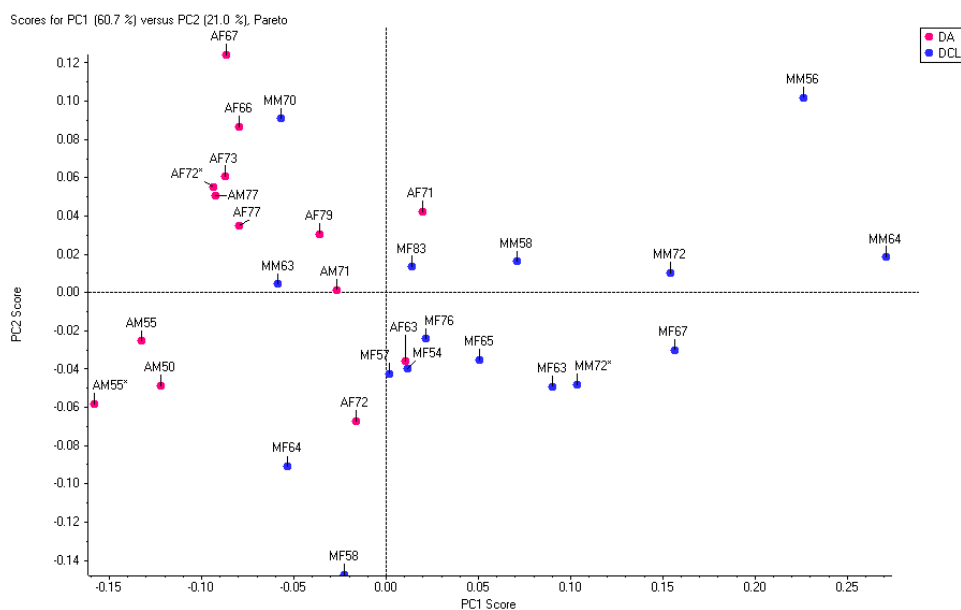


Figura 17 - Análise PCA para o grupo DA vs. DCL. Apenas foram usadas as proteínas selecionadas com alteração neste grupo de estudo. Cada ponto está identificado de acordo com a patologia, o género e a idade.

Verifica-se que com este grupo de proteínas se consegue observar uma tendência de separação entre as patologias, isto indica que possivelmente estas proteínas possam ser capazes de distinguir a DA do DCL, embora sejam necessários mais estudos de forma a compreender melhor esta distinção.

5 Conclusão

Conclusão

Um dos grandes desafios da DA é o facto do diagnóstico ser tardio e impreciso. Sendo uma doença que se torna cada vez mais preocupante a nível internacional e da qual se sabe que as alterações moleculares começam décadas antes dos sintomas é imprescindível encontrar um diagnóstico na primeira fase da doença. Desta forma o objetivo deste trabalho visou estudar o LCR de doentes com DA e comparar com o LCR de doentes com DCL, possibilitando identificar alterações no proteoma no início da patologia, assim como alterações únicas em cada uma das doenças.

Foram realizados primeiramente testes em plasma para validação do processamento das amostras, o que mostraram que o método utilizado é adequado para este tipo de procedimentos.

Um dos objetivos deste trabalho consistiu em estudar o proteoma da DA. Através das diversas análises foi possível observar a diferença do género na doença, a quantidade de proteínas alteradas com significância estatística é significativamente maior em mulheres, com 94 proteínas alteradas para o género feminino e 26 para o masculino. Esta indicação também foi comprovada pela análise PCA, onde se verificou uma clara separação entre os dois géneros. Em todas as análises PCA relativas ao estudo do género foi possível observar uma clara separação dentro da DA e uma tendência muito forte nas comparações entre masculinos e femininos.

Observou-se uma variação significativa nas proteínas IGHG3 e FBLN1 apenas no grupo masculino (DA Vs. DCL) o que pode indicar uma possível relação da doença com o género masculino, embora também é necessário salientar que devido ao número reduzido de amostras para comparação é necessários novos estudo para validar esta informação.

Todos estes indícios sugerem que há uma possível ligação da patologia com o género e possivelmente será importante em estudos futuros este ser um fator a ter-se em conta.

Salienta-se também as proteínas Apolipoproteína AI e Protrombina apresentaram-se alteradas nos três indivíduos mais jovens com a DA, podendo indicar uma possível relação com a idade precoce da doença, porém, uma vez que o grupo em estudo é composto por poucos indivíduos dentro dessa gama de idade, torna-se necessário novos estudos para validação.

Foram analisadas as proteínas selecionadas nos diferentes métodos que se apresentaram alteradas no grupo DA Vs. DCL, resultando desta forma num grupo com 19

54| Conclusão

proteínas de interesse. Após um estudo sobre cada proteína, foi possível identificar a ligação de cada uma à DA. Observou-se que maioritariamente as proteínas identificadas estão relacionadas de alguma forma com as placas amiloides e encontram-se todas, diminuídas na doença de Alzheimer. Foram também identificadas proteínas relacionadas a processos inflamatórios, stresse oxidativo, microtúbulos e entre outros mecanismos. Os valores de variação foram na sua maioria coerentes com outras publicações.

Visto que um dos objetivos é tentar encontrar proteínas que permitam a distinção entre doentes de Alzheimer e doentes de DCL, foi realizada uma análise PCA para as 19 proteínas seleccionadas de interesse. Esta pesquisa permitiu verificar que com este conjunto de proteínas é possível observar uma tendência na distinção entre as doenças, podendo futuramente ser um possível painel de biomarcadores para a distinção da DA com DCL.

Embora alguns estudos já destaquem algumas destas proteínas como possíveis biomarcadores para a DA e os resultados deste trabalho demonstrem ser promissores é necessário salientar a importância da realização de mais estudos e com um maior número de amostras, tornando possível validar esta informação.

7 Referências bibliográficas

Referências Bibliográficas

ALBERT, M. S., [et al.] (2011) — The diagnosis of mild cognitive impairment 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, (2011), 270-279

ALLEN, S. J., WATSON, J. J. & DAWBARN, D. (2011) — The neurotrophins and their role in Alzheimer's disease. "Curr Neuropharmacol" 9, (2011), 559-573

ALTMANN, A., [et al.] (2014) — Sex modifies the APOE-related risk of developing Alzheimer disease. "Ann Neurol" 75, (2014), 563-573

ALZHEIMER, A., [et al.] (1995) — An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkankung der Hirnrinde". "Clin Anat" 8, (1995), 429-431

ANDERSEN, K., [et al.] (1999) — Gender differences in the incidence of AD and vascular dementia: The EURODEM Studies. EURODEM Incidence Research Group. "Neurology" 53, (1999), 1992-1997

ARAI, T., [et al.] (2006) — Thrombin and prothrombin are expressed by neurons and glial cells and accumulate in neurofibrillary tangles in Alzheimer disease brain. "J Neuropathol Exp Neurol" 65, (2006), 19-25

ARMSTRONG, A., [et al.] (2014) — Lysosomal network proteins as potential novel CSF biomarkers for Alzheimer's disease. "Neuromolecular Med" 16, (2014), 150-160

ASHBY, E. L., KEHOE, P. G. & LOVE, S. (2010) — Kallikrein-related peptidase 6 in Alzheimer's disease and vascular dementia. "Brain Res" 1363, (2010), 1-10

BARAGE, S. H. & SONAWANE, K. D. (2015) — Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. "Neuropeptides" 52, (2015), 1-18

BARBOSA, E. B., [et al.] (2012) — Proteomics: methodologies and applications to the study of human diseases. "Rev Assoc Med Bras (1992)" 58, (2012), 366-375

BARRERA-OCAMPO, A., [et al.] (2016) — Amyloid-beta Precursor Protein Modulates the Sorting of Testican-1 and Contributes to Its Accumulation in Brain Tissue and Cerebrospinal Fluid from Patients with Alzheimer Disease. "J Neuropathol Exp Neurol" 75, (2016), 903-916

BERTRAM, L., LILL, C. M. & TANZI, R. E. (2010) — The genetics of Alzheimer disease: back to the future. "Neuron" 68, (2010), 270-281

BILOUSOVA, T., [et al.] (2015) — Parallel age-associated changes in brain and plasma neuronal pentraxin receptor levels in a transgenic APP/PS1 rat model of Alzheimer's disease. "Neurobiol Dis" 74, (2015), 32-40

BIOMARKERS DEFINITIONS WORKING, G. (2001) — Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. "Clin Pharmacol Ther" 69, (2001), 89-95

BLENNOW, K. (2004) — Cerebrospinal fluid protein biomarkers for Alzheimer's disease. "NeuroRx" 1, (2004), 213-225

BLENNOW, K., [et al.] (2015) — Clinical utility of cerebrospinal fluid biomarkers in the diagnosis of early Alzheimer's disease. "Alzheimers Dement" 11, (2015), 58-69

BRADSHAW, N. J. & HAYASHI, M. A. (2016) — NDE1 and NDEL1 from genes to (mal)functions: parallel but distinct roles impacting on neurodevelopmental disorders and psychiatric illness. "Cell Mol Life Sci", (2016),

CASTANO, E. M., [et al.] (2006) — Comparative proteomics of cerebrospinal fluid in neuropathologically-confirmed Alzheimer's disease and non-demented elderly subjects. "Neurol Res" 28, (2006), 155-163

CASTRO-CHAVIRA, S. A., [et al.] (2015) — Genetic markers in biological fluids for aging-related major neurocognitive disorder. "Curr Alzheimer Res" 12, (2015), 200-209

CHAKRABARTI, S., [et al.] (2015) — Metabolic Risk Factors of Sporadic Alzheimer's Disease: Implications in the Pathology, Pathogenesis and Treatment. "Aging Dis" 6, (2015), 282-299

CHESIK, D., [et al.] (2004) — Insulin-like growth factor binding protein-1-6 expression in activated microglia. "Neuroreport" 15, (2004), 1033-1037

DASS, Chhabil — Fundamentals of contemporary mass spectrometry. New Jersey: JohnWiley & Sons, 2007. ISBN 978-0-471-68229-5

ASSATI, S., WALDNER, A. & SCHWEIGREITER, R. (2014) — Apolipoprotein D takes center stage in the stress response of the aging and degenerative brain. "Neurobiol Aging" 35, (2014), 1632-1642

DEANE, R., [et al.] (2008) — apoE isoform-specific disruption of amyloid beta peptide clearance from mouse brain. "J Clin Invest" 118, (2008), 4002-4013

DENG, A., [et al.] (2001) — Elevation of cystatin C in susceptible neurons in Alzheimer's disease. "Am J Pathol" 159, (2001), 1061-1068

- DIMAS, L. F. & PUCCIONI-SOHLER, M. (2008) — Exame do líquido cefalorraquidiano: influência da temperatura, tempo e preparo da amostra na estabilidade analítica. "Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial" 44, (2008), 97-106
- DINIZ, B. S. D. O. & FORLENZA, O. V. (2007) — O uso de biomarcadores no líquido cefalorraquidiano no diagnóstico precoce da doença de Alzheimer. "Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)" 34, (2007), 144-145
- DUMAN, J. G., TU, Y. K. & TOLIAS, K. F. (2016) — Emerging Roles of BAI Adhesion-GPCRs in Synapse Development and Plasticity. "Neural Plast" 2016, (2016), 8301737
- FALCO, A. D., [et al.] (2016) — DOENÇA DE ALZHEIMER: HIPÓTESES ETIOLÓGICAS E PERSPECTIVAS DE TRATAMENTO. "Química Nova" 39, (2016), 63-80
- HAAS, L. T. & STRITTMATTER, S. M. (2016) — Oligomers of Amyloid beta Prevent Physiological Activation of the Cellular Prion Protein-Metabotropic Glutamate Receptor 5 Complex by Glutamate in Alzheimer Disease. "J Biol Chem" 291, (2016), 17112-17121
- HE, H., [et al.] (2016) — Phosphatidylethanolamine binding protein 4 (PEBP4) is a secreted protein and has multiple functions. "Biochim Biophys Acta" 1863, (2016), 1682-1689
- HOHMAN, T. J., [et al.] (2015) — The role of vascular endothelial growth factor in neurodegeneration and cognitive decline: exploring interactions with biomarkers of Alzheimer disease. "JAMA Neurol" 72, (2015), 520-529
- HOLTZMAN, D. M., MORRIS, J. C. & GOATE, A. M. (2011) — Alzheimer's disease: the challenge of the second century. "Sci Transl Med" 3, (2011), 77sr71
- HOOPER, C., LOVESTONE, S. & SAINZ-FUERTES, R. (2008) — Alzheimer's Disease, Diagnosis and the Need for Biomarkers. "Biomark Insights" 3, (2008), 317-323
- HUCK, S., [et al.] (1986) — Sequence of a human immunoglobulin gamma 3 heavy chain constant region gene: comparison with the other human C gamma genes. "Nucleic Acids Res" 14, (1986), 1779-1789
- HUMPEL, C. (2011) — Identifying and validating biomarkers for Alzheimer's disease. "Trends Biotechnol" 29, (2011), 26-32
- IQBAL, K., [et al.] (2010) — Tau in Alzheimer disease and related tauopathies. "Curr Alzheimer Res" 7, (2010), 656-664
- KANG, J. H., [et al.] (2014) — Role of cerebrospinal fluid biomarkers in clinical trials for Alzheimer's disease modifying therapies. "Korean J Physiol Pharmacol" 18, (2014), 447-456

60| Referências Bibliográficas

- KEE, H. J., [et al.] (2002) — Expression of brain-specific angiogenesis inhibitor 2 (BAI2) in normal and ischemic brain: involvement of BAI2 in the ischemia-induced brain angiogenesis. "J Cereb Blood Flow Metab" 22, (2002), 1054-1067
- KELLY, K. K., [et al.] (2016) — Col1a1+ perivascular cells in the brain are a source of retinoic acid following stroke. "BMC Neurosci" 17, (2016), 49
- KIMBERLY, W. T., [et al.] (2000) — The transmembrane aspartates in presenilin 1 and 2 are obligatory for gamma-secretase activity and amyloid beta-protein generation. "J Biol Chem" 275, (2000), 3173-3178
- KLINMAN, E. & HOLZBAUR, E. L. (2015) — Stress-Induced CDK5 Activation Disrupts Axonal Transport via Lis1/Ndel1/Dynein. "Cell Rep" 12, (2015), 462-473
- KINTER, Michael e SHERMAN, Nicholas E. — Protein Sequencing and Identification using Tandem Mass Spectrometry. New York: Jphnwiley & Sons, 2000. ISBN 0-471-32249-0.
- KOROLAINEN, M. A., [et al.] (2010) — An update on clinical proteomics in Alzheimer's research. "J Neurochem" 112, (2010), 1386-1414
- LI, H., [et al.] (2015) — Apolipoprotein D modulates amyloid pathology in APP/PS1 Alzheimer's disease mice. "Neurobiol Aging" 36, (2015), 1820-1833
- LIU, S. L., [et al.] (2016) — The Role of Cdk5 in Alzheimer's Disease. "Mol Neurobiol" 53, (2016), 4328-4342
- LYGIROU, V., MAKRIDAKIS, M. & VLAHOU, A. (2015) — Biological sample collection for clinical proteomics: existing SOPs. "Methods Mol Biol" 1243, (2015), 3-27
- MA, L. Y., [et al.] (2017) — Autophagy-lysosome dysfunction is involved in Aβ deposition in STZ-induced diabetic rats. "Behav Brain Res" 320, (2017), 484-493
- MA, Q. Y., [et al.] (2011) — Mimecan in pituitary corticotroph cells may regulate ACTH secretion and the HPA axis. "Mol Cell Endocrinol" 341, (2011), 71-77
- MACCIONI, R. B., [et al.] (2010) — The revitalized tau hypothesis on Alzheimer's disease. "Arch Med Res" 41, (2010), 226-231
- MARKESBERY, W. R. (1997) — Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. "Free Radic Biol Med" 23, (1997), 134-147
- MULTHAUP, G., [et al.] (2015) — Amyloid Precursor Protein (APP) Metabolites APP Intracellular Fragment (AICD), Aβ42, and Tau in Nuclear Roles. "J Biol Chem" 290, (2015), 23515-23522
- MURPHY, K. E., [et al.] (2015) — Lysosomal-associated membrane protein 2 isoforms are differentially affected in early Parkinson's disease. "Mov Disord" 30, (2015), 1639-1647

- NAGASAWA, A., [et al.] (1997) — Cloning of the cDNA for a new member of the immunoglobulin superfamily (ISLR) containing leucine-rich repeat (LRR). "Genomics" 44, (1997), 273-279
- NIU, H., [et al.] (2016) — Prevalence and incidence of Alzheimer's disease in Europe: A meta-analysis. "Neurologia", (2016),
- OHSAWA, I., TAKAMURA, C. & KOHSAKA, S. (2001) — Fibulin-1 binds the amino-terminal head of beta-amyloid precursor protein and modulates its physiological function. "J Neurochem" 76, (2001), 1411-1420
- PARIHAR, M. S. & HEMNANI, T. (2004) — Alzheimer's disease pathogenesis and therapeutic interventions. "J Clin Neurosci" 11, (2004), 456-467
- PAULA-LIMA, A. C., [et al.] (2009) — Human apolipoprotein A-I binds amyloid-beta and prevents Aβ-induced neurotoxicity. "Int J Biochem Cell Biol" 41, (2009), 1361-1370
- PEI, Z., [et al.] (2014) — The expression and roles of Nde1 and Ndel1 in the adult mammalian central nervous system. "Neuroscience" 271, (2014), 119-136
- PLA, V., [et al.] (2013) — Secretory sorting receptors carboxypeptidase E and secretogranin III in amyloid beta-associated neural degeneration in Alzheimer's disease. "Brain Pathol" 23, (2013), 274-284
- POIRIER, J., [et al.] (1993) — Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. "Lancet" 342, (1993), 697-699
- PORTET, F., [et al.] (2006) — Mild cognitive impairment (MCI) in medical practice: a critical review of the concept and new diagnostic procedure. Report of the MCI Working Group of the European Consortium on Alzheimer's Disease. "J Neurol Neurosurg Psychiatry" 77, (2006), 714-718
- PORTUGAL. Direção-Geral da Saúde — Abordagem terapêutica das alterações cognitivas, Norma 053/2011. Lisboa: DGS, 2011
- PRINCE, M., [et al.] — The Global Impact of Dementia: an analysis of prevalence, incidence, cost and trends. World Alzheimer Report 2015. London: Alzheimer's Disease International (ADI), 2015. [Acedido a 22 de Janeiro de 2016]. Disponível na internet: <https://www.alz.co.uk/research/world-report-2015>.
- QADI, Najeeb; ALIPOUR Sina and BEATTIE Blynn — Pathophysiology of Alzheimer's disease. In: HOWARD H. Feldman. Atlas of Alzheimer's Disease. United Kingdom: Informa healthcare, 2007a. ISBN-10:0415390451, 59-69

- QADI, Najeeb; FELDMAN, howard H. — The diagnosis of Alzheimer's disease and dementia. In: HOWARD H. Feldman. Atlas of Alzheimer's Disease. United Kingdom: Informa healthcare, 2007b. ISBN-10:0415390451,
- RAY, S., [et al.] (2007) — Classification and prediction of clinical Alzheimer's diagnosis based on plasma signaling proteins. "Nat Med" 13, (2007), 1359-1362
- REMBACH, A., [et al.] (2015) — Bayesian graphical network analyses reveal complex biological interactions specific to Alzheimer's disease. "J Alzheimers Dis" 44, (2015), 917-925
- RIBEIRO, C. A., [et al.] (2012) — Transthyretin decrease in plasma of MCI and AD patients: investigation of mechanisms for disease modulation. "Curr Alzheimer Res" 9, (2012), 881-889
- RINGMAN, J. M., [et al.] (2012) — Proteomic changes in cerebrospinal fluid of presymptomatic and affected persons carrying familial Alzheimer disease mutations. "Arch Neurol" 69, (2012), 96-104
- ROSS, C. A. & POIRIER, M. A. (2004) — Protein aggregation and neurodegenerative disease. "Nat Med" 10 Suppl, (2004), S10-17
- SAMPEDRO, F., [et al.] (2015) — APOE-by-sex interactions on brain structure and metabolism in healthy elderly controls. "Oncotarget" 6, (2015), 26663-26674
- SCHRAEN-MASCHKE, S., [et al.] (2008) — Tau as a biomarker of neurodegenerative diseases. "Biomark Med" 2, (2008), 363-384
- SELKOE, D. J. (2001) — Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. "Physiol Rev" 81, (2001), 741-766
- SERENIKI, A. & VITAL, M. A. B. F. (2008) — A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos. "Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul" 30, (2008), 0-0
- SERGEANT, N., DELACOURTE, A. & BUEE, L. (2005) — Tau protein as a differential biomarker of tauopathies. "Biochim Biophys Acta" 1739, (2005), 179-197
- SHIM, S. Y., [et al.] (2008) — Ndel1 controls the dynein-mediated transport of vimentin during neurite outgrowth. "J Biol Chem" 283, (2008), 12232-12240
- SODERBLOM, C., [et al.] (2013) — Perivascular fibroblasts form the fibrotic scar after contusive spinal cord injury. "J Neurosci" 33, (2013), 13882-13887
- SOLLNER, C. & WRIGHT, G. J. (2009) — A cell surface interaction network of neural leucine-rich repeat receptors. "Genome Biol" 10, (2009), R99
- STOEVRING, B., [et al.] (2005) — Tetranectin in cerebrospinal fluid: biochemical characterisation and evidence of intrathecal synthesis or selective uptake into CSF. "Clin Chim Acta" 359, (2005), 65-71

- STOPPINI, M. & BELLOTTI, V. (2015) — Systemic amyloidosis: lessons from beta2-microglobulin. "J Biol Chem" 290, (2015), 9951-9958
- STOPPINI, M., [et al.] (1995) — Characterization of the two unique human anti-flavin monoclonal immunoglobulins. "Eur J Biochem" 228, (1995), 886-893
- SUO, Z., CITRON, B. A. & FESTOFF, B. W. (2004) — Thrombin: a potential proinflammatory mediator in neurotrauma and neurodegenerative disorders. "Curr Drug Targets Inflamm Allergy" 3, (2004), 105-114
- TOLOSANO, E., [et al.] (2010) — Heme scavenging and the other facets of hemopexin. "Antioxid Redox Signal" 12, (2010), 305-320
- TSAI, M. S., [et al.] (1994) — Apolipoprotein E: risk factor for Alzheimer disease. "Am J Hum Genet" 54, (1994), 643-649
- USA. National Institute on Aging— Alzheimer's Disease Fact Sheet, 2016. [Acedido a 23 de Agosto de 2016]. Disponível na internet: <https://www.nia.nih.gov/alzheimers/publication/alzheimers-disease-fact-sheet>
- VASSAR, R. (2004) — BACE1: the beta-secretase enzyme in Alzheimer's disease. "J Mol Neurosci" 23, (2004), 105-114
- WALKER, L. C., SCHELLE, J. & JUCKER, M. (2016) — The Prion-Like Properties of Amyloid-beta Assemblies: Implications for Alzheimer's Disease. "Cold Spring Harb Perspect Med" 6, (2016),
- WANG, E. S., [et al.] (2010) — Tetranectin and apolipoprotein A-I in cerebrospinal fluid as potential biomarkers for Parkinson's disease. "Acta Neurol Scand" 122, (2010), 350-359
- YIN, G. N., [et al.] (2009) — Neuronal pentraxin receptor in cerebrospinal fluid as a potential biomarker for neurodegenerative diseases. "Brain Res" 1265, (2009), 158-170
- ZHANG, Y. W., [et al.] (2011) — APP processing in Alzheimer's disease. "Mol Brain" 4, (2011), 3

8 Material suplementar

8.1 Modo de aquisição de dados SWATH

Tabela Suplementar S.I – Janelas obtidas a partir do modo de aquisição SWATH. Esta informação é referente a análise das amostras de LCR. A cada janela, corresponde um intervalo de massa (m/z), uma largura em Da e a respetiva rampa de colisão.

Janela	Intervalo de massas m/z	Largura da janela (Da)	Rampa de Energia de Colisão
Janela 1	349.5-360.4	10,9	5
Janela 2	359.4-371.2	11,8	5
Janela 3	370.2-382.4	12,2	5
Janela 4	381.4-392.3	10,9	5
Janela 5	391.3-401.3	10	5
Janela 6	400.3-410.8	10,5	5
Janela 7	409.8-419.3	9,5	5
Janela 8	418.3-428.3	10	5
Janela 9	427.3-437.3	10	5
Janela 10	436.3-445.9	9,6	5
Janela 11	444.9-453.5	8,6	5
Janela 12	452.5-461.6	9,1	5
Janela 13	460.6-469.7	9,1	5
Janela 14	468.7-477.4	8,7	5
Janela 15	476.4-485	8,6	5
Janela 16	484-492.7	8,7	5
Janela 17	491.7-499.4	7,7	5
Janela 18	498.4-506.2	7,8	5
Janela 19	505.2-513.4	8,2	5
Janela 20	512.4-520.6	8,2	5
Janela 21	519.6-527.8	8,2	5
Janela 22	526.8-535.4	8,6	5
Janela 23	534.4-543.1	8,7	5
Janela 24	542.1-549.9	7,8	5
Janela 25	548.9-556.6	7,7	5
Janela 26	555.6-563.8	8,2	5
Janela 27	562.8-571	8,2	5
Janela 28	570-578.7	8,7	5
Janela 29	577.7-586.8	9,1	5
Janela 30	585.8-595.3	9,5	5
Janela 31	594.3-604.3	10	5
Janela 32	603.3-614.2	10,9	5
Janela 33	613.2-625	11,8	5
Janela 34	624-636.7	12,7	5
Janela 35	635.7-647.5	11,8	5
Janela 36	646.5-657	10,5	5
Janela 37	656-666.9	10,9	5
Janela 38	665.9-676.3	10,4	5

Tabela Suplementar S.I - Continuação.

Janela	Intervalo de massas m/z	Largura da janela (Da)	Rampa de Energia de Colisão
Janela 39	675.3-686.7	11,4	5
Janela 40	685.7-697.9	12,2	5
Janela 41	696.9-708.3	11,4	5
Janela 42	707.3-719.1	11,8	5
Janela 43	718.1-730.3	12,2	5
Janela 44	729.3-739.8	10,5	5
Janela 45	738.8-748.8	10	5
Janela 46	747.8-758.2	10,4	5
Janela 47	757.2-767.2	10	5
Janela 48	766.2-777.6	11,4	5
Janela 49	776.6-789.3	12,7	5
Janela 50	788.3-802.3	14	8
Janela 51	801.3-819.4	18,1	8
Janela 52	818.4-839.2	20,8	8
Janela 53	838.2-863.1	24,9	8
Janela 54	862.1-891	28,9	8
Janela 55	890-927	37	8
Janela 56	926-972.4	46,4	8
Janela 57	971.4-1007.5	36,1	8
Janela 58	1006.5-1050.7	44,2	10
Janela 59	1049.7-1129.5	79,8	10
Janela 60	1128.5-1249.6	121,1	10

8.2 Teste de reprodutibilidade do procedimento

Para garantir que o procedimento utilizado na preparação das amostras, era adequado ao estudo do LCR, realizou-se um estudo com plasma. A quantificação relativa de cada réplica desse estudo foi comparada, e está representada. Nesta figura, está presente o valor da Albumina, que como componente maioritário no LCR, apresenta valores muito superiores às restantes proteínas.

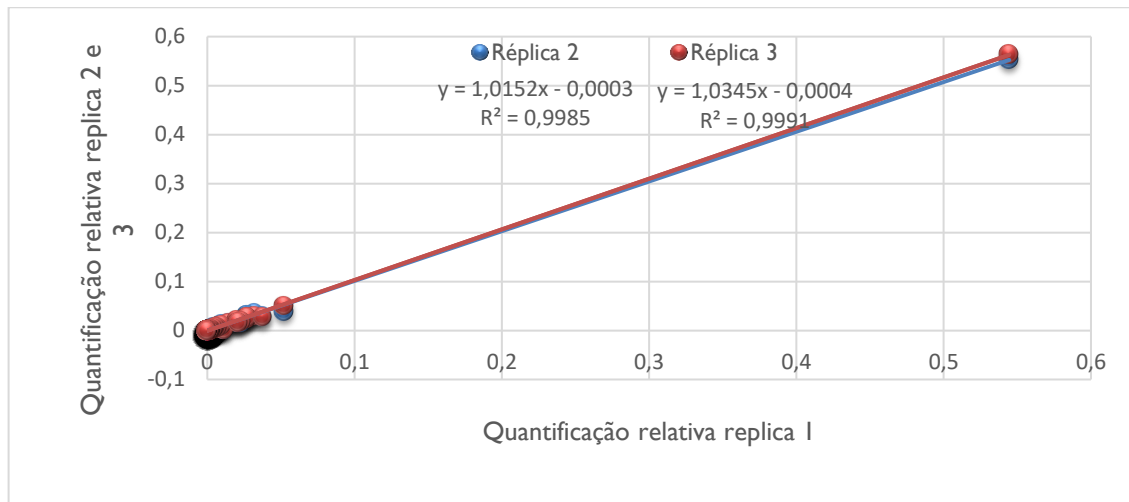


Figura suplementar S.1 – Relação da quantificação relativa entre as 3 réplicas em estudo. As linhas de tendência mostram uma relação linear entre as amostras e os seus respectivos coeficientes de correlação com valores muito próximos de 1.

8.3 DA Vs. DCL

Os géis resultantes do processo de SDS-PAGE (ver secção 3.4) foram analisados por luz ultravioleta, sendo posteriormente medida a intensidade de cada faixa correspondente a cada uma das patologias. Observa-se uma grande diferença na intensidade das amostras, indicando uma quantidade de proteína bastante elevada na amostra de DCL.

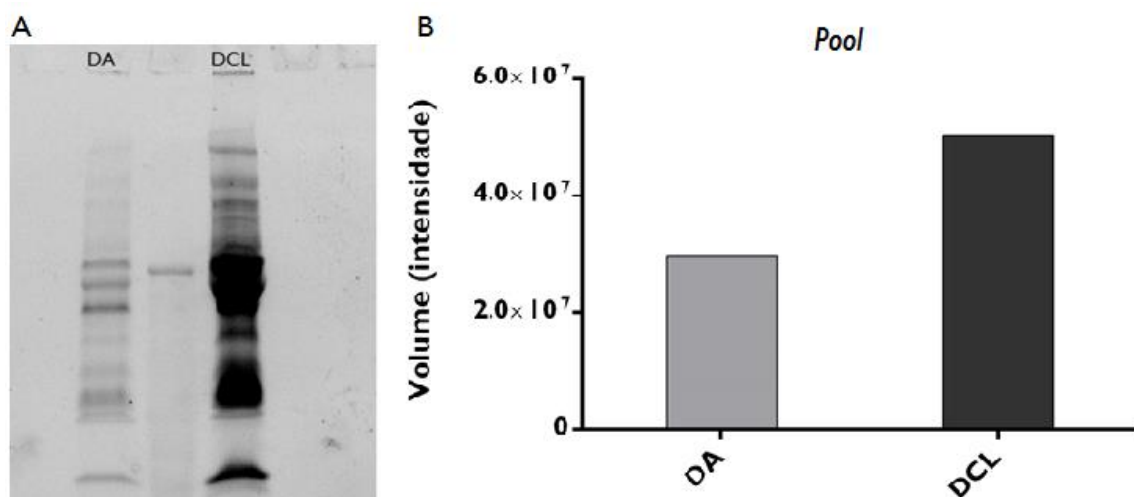


Figura suplementar S.2 – Análise do perfil proteico por luz ultravioleta das amostras de LCR, referentes ao *pool*, e respetivo volume. A- Perfil das proteínas presentes no *pool* das amostras de DA e DCL. B- Volume de ambas as faixas representadas em A. .

Para os restantes géis, foram realizadas as mesmas análises a partir de cada perfil proteico, neste caso referente a cada amostra. O volume foi somado consoante a patologia e

está representado na Figura Suplementar S.3. Observa-se que as amostras de DCL apresentam uma maior quantidade de proteína, porém nada discrepante.

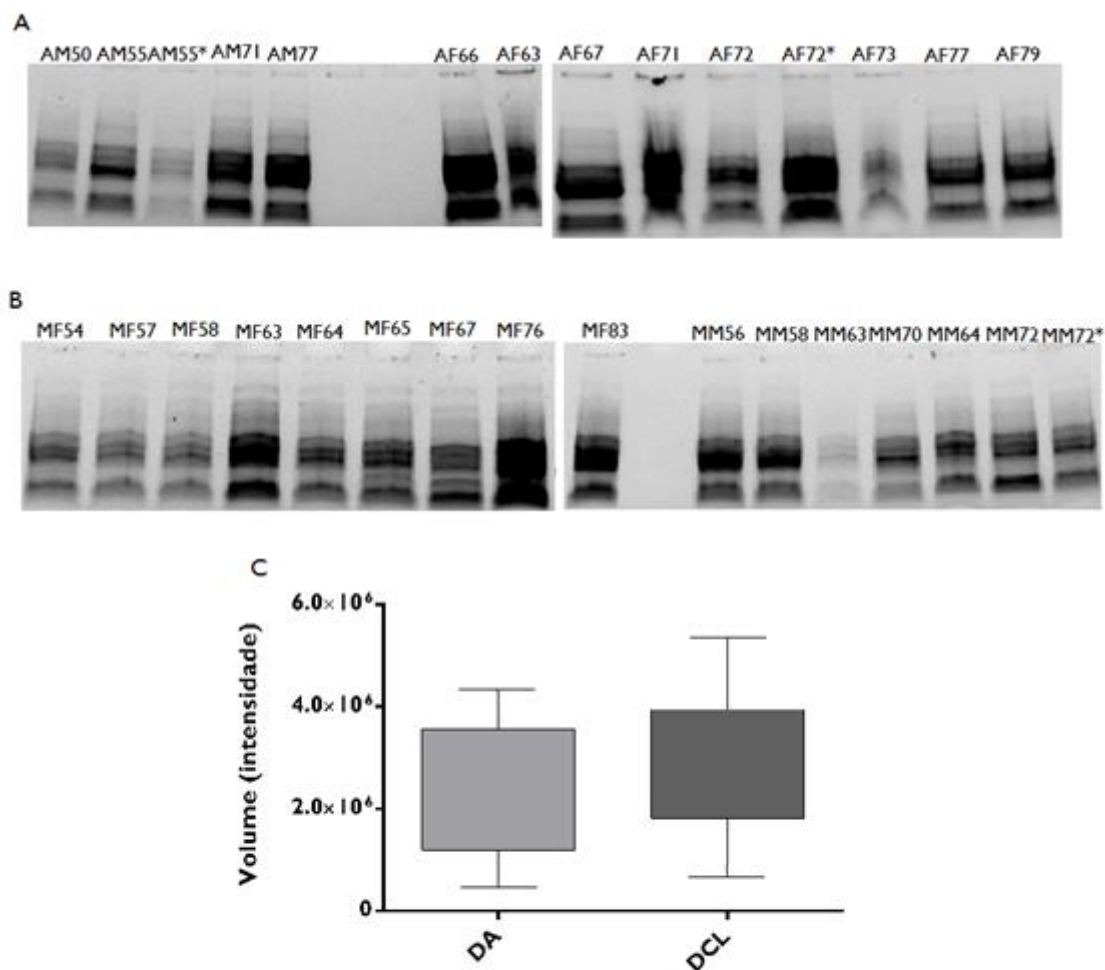


Figura suplementar S.3- Análise do perfil proteico por luz ultravioleta de todas as amostras de LCR e respetiva intensidade para cada patologia. A- Perfil proteico das amostras de LCR de indivíduos com DA. B- Perfil proteico das amostras de LCR de indivíduos com DCL. C- Representação da soma de todos os volumes das amostras de DA e soma de todos os volumes de DCL. Cada amostra está identificada consoante a patologia, o género e a idade.

8.4 Análise dos perfis proteicos obtidos por PCA

Para seleção das proteínas de interesse pelo método de PCA, foram escolhidas as que se mostraram mais distantes do centro do eixo, uma vez que têm um impacto maior na separação dos componentes. Apesar deste facto, é importante olhar para o perfil de cada proteína, visto que proteínas que têm muita variação entre as amostras não apresentam um bom perfil de comparação.

Os perfis de todas proteínas selecionadas estão representadas da Figura suplementar S.4 a Figura suplementar S.7.

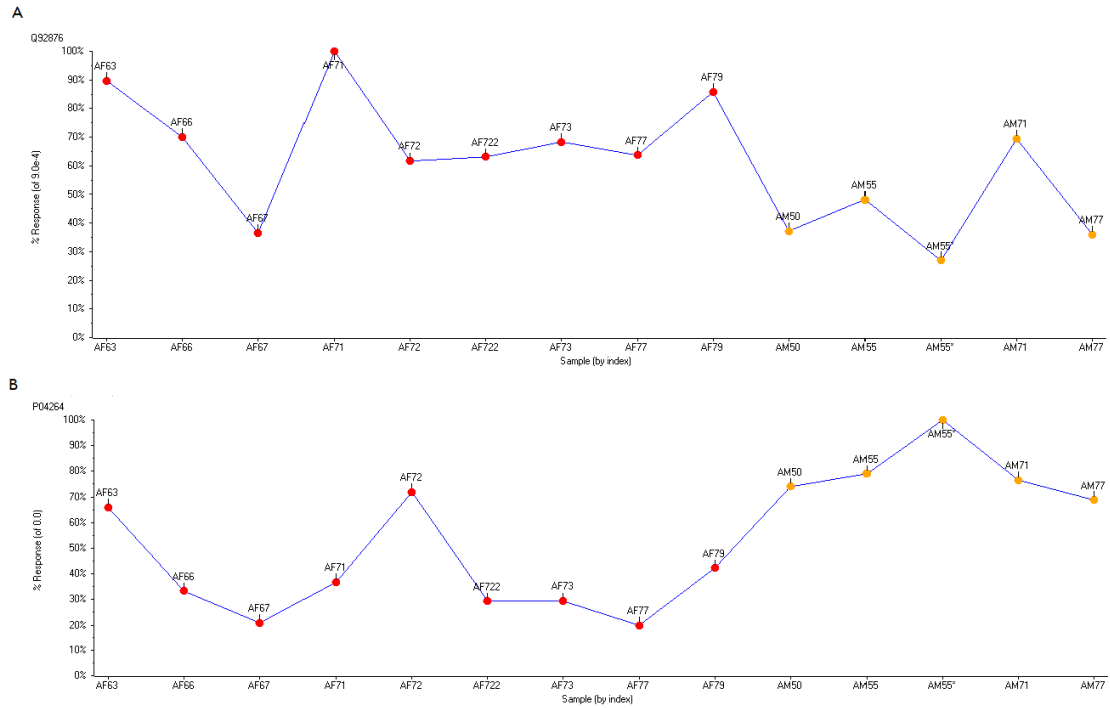


Figura suplementar S.4 - Perfil das Proteínas alteradas na comparação entre os géneros na DA. A- Perfil da proteína Calicreína 6 (Q92876) B- Perfil da proteína queratina tipo 2, citosqueleto I (P04264).

72| Material suplementar

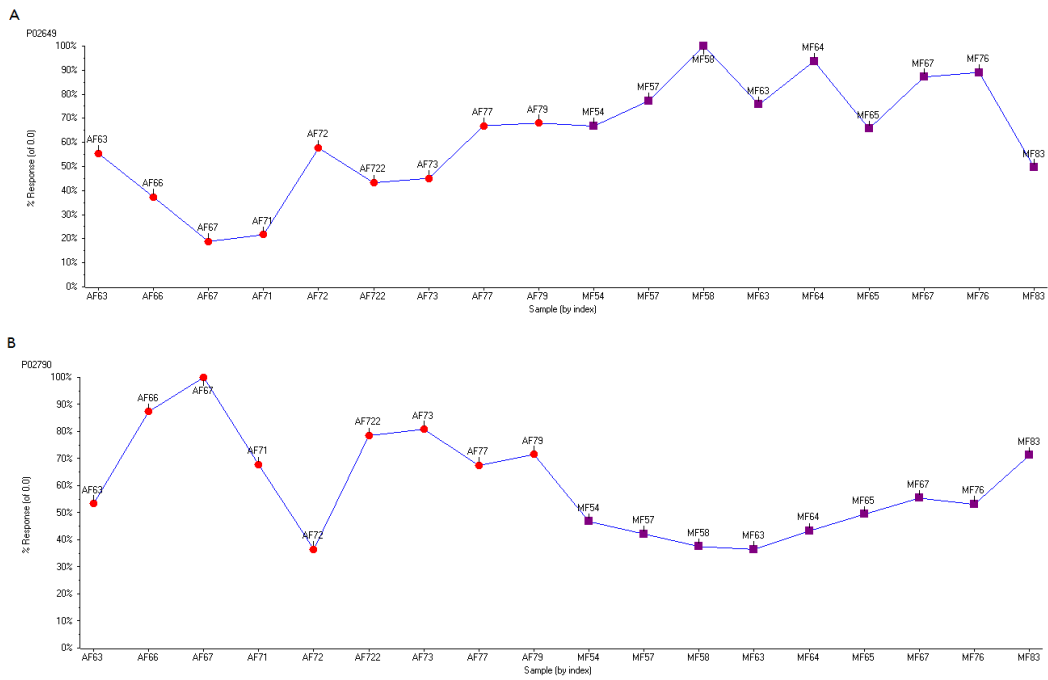


Figura suplementar S.5- Perfil das Proteínas alteradas apenas no género feminino na comparação entre DA e DCL. A- Perfil da proteína Apolipoproteína E (P02649) B- Perfil da proteína Hemopexina (P02790).

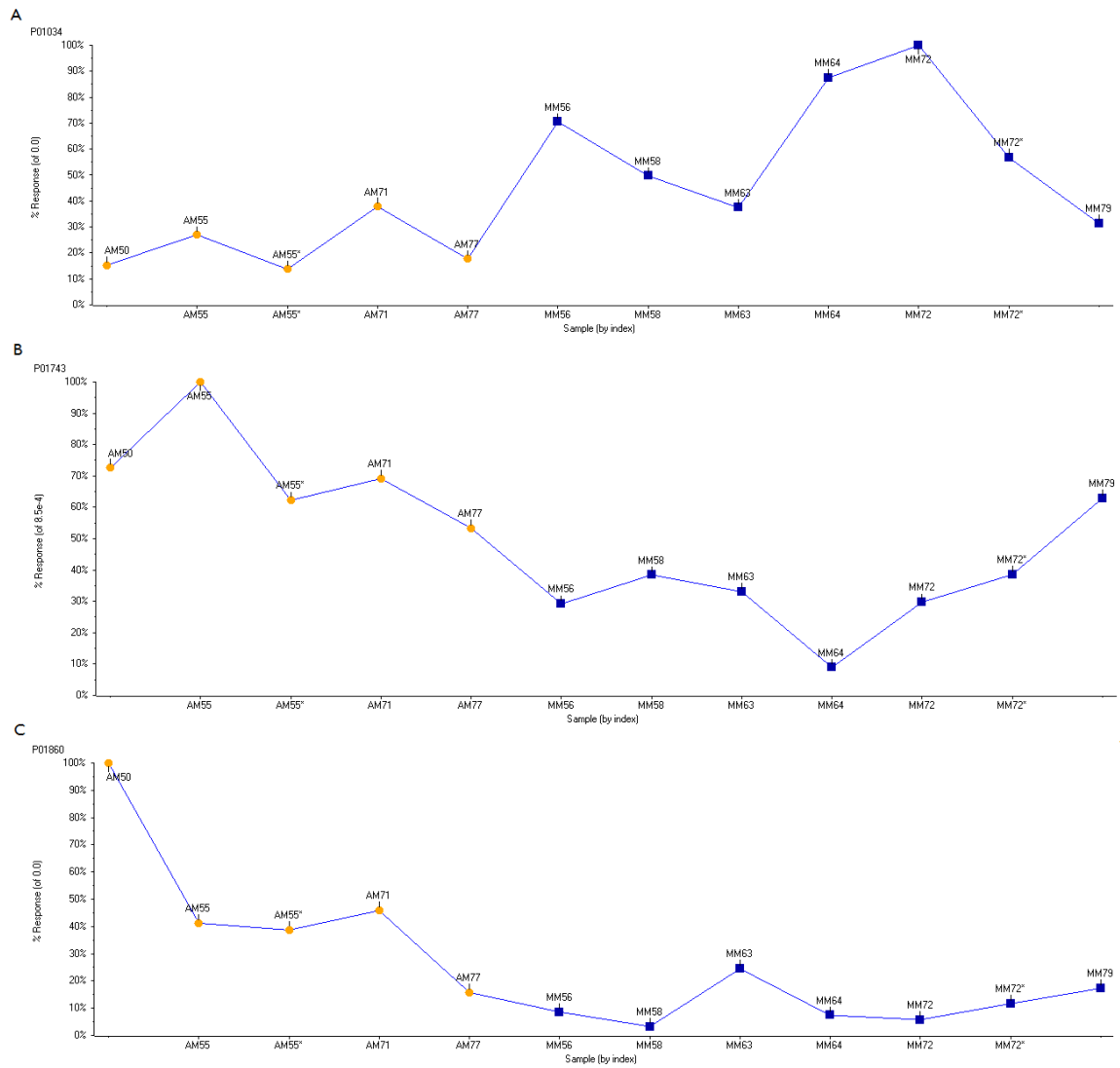


Figura suplementar S.6- Perfil das Proteínas alteradas apenas no género masculino na comparação entre DA e DCL. A- Perfil da proteína Cistatina C (P01034) B- Perfil da proteína Imunoglobulina variável I-46 (P01743) C- Perfil da proteína-Região Ig cadeia gama-3 (P01860).

74| Material suplementar

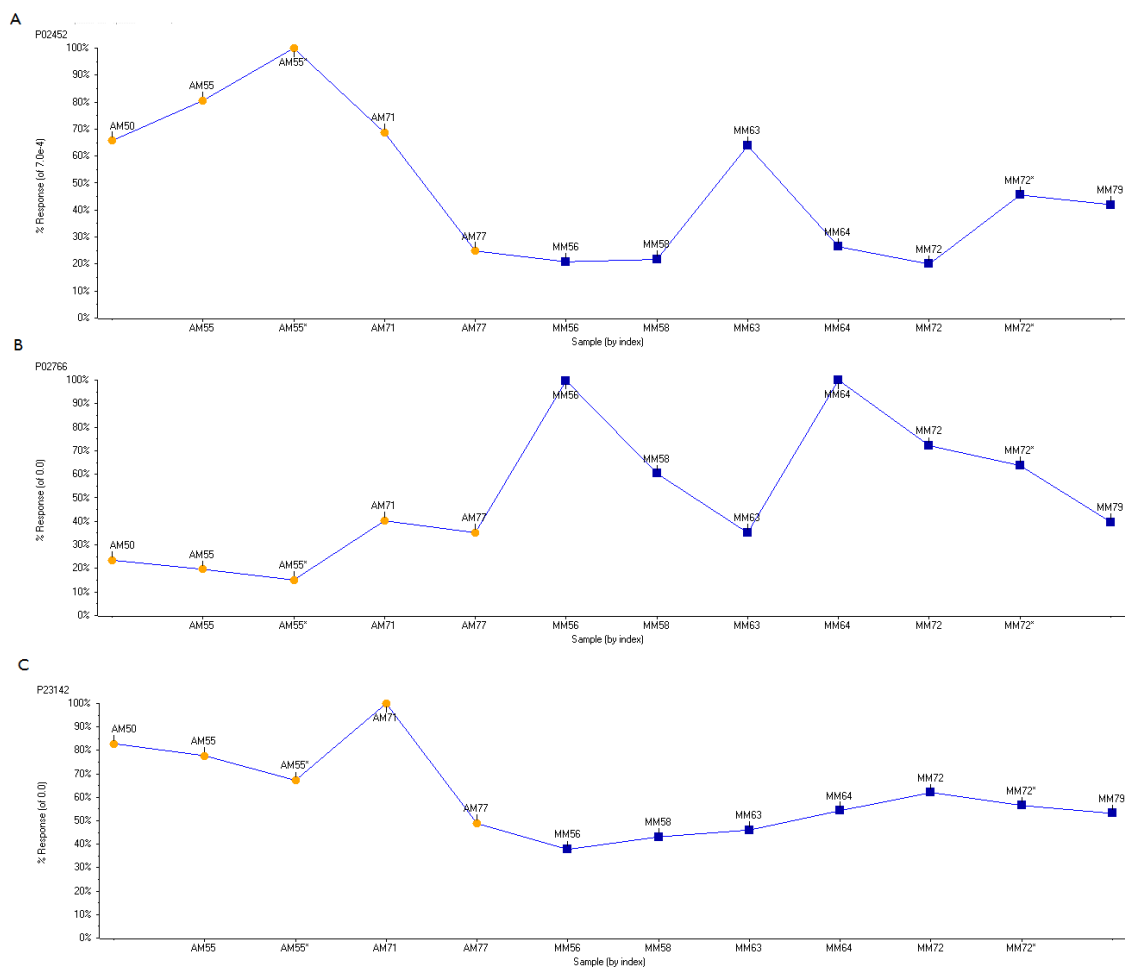


Figura suplementar S.7- Continuação do perfil das Proteínas alteradas apenas no género masculino na comparação entre DA e DCL. A- Perfil da proteína Cadeia de colagénio α -I tipo I (P02452) B- Perfil da proteína transtirretina (P02766). C- Perfil da proteína Fibulina I (P23142).

8.5 Estudo das proteínas seleccionadas

Após realizada a seleção das proteínas de interesse, foi realizado um estudo individual para todas proteínas que se mostraram alteradas na comparação entre DA e DCL, uma vez que se pretendia compreender a distinção entre as duas patologias.

Foi desta forma distinguida a relação de cada proteína com a DA e as respetivas referências da informação recolhida, assim como a sua variação. Esta informação está descrita na Tabela suplementar S.2.

Tabela Suplementar S.2 – Informação sobre a relação das proteínas selecionadas e alteradas no grupo DA Vs. DCL, com a respectiva relação com a DA, os valores de variação e a referência destas.

Proteína	Relação com a patologia de Alzheimer				Valores de variação	Referências
	Neuroinflamação	stress oxidativo	Relação com β A	Outras		
TETN			X		0,26	(Stoevring et al., 2005) (Wang et al., 2010)
SCG3			X		0,45	(Pla et al., 2013)
PRI0			X		0,47	(Haas and Strittmatter, 2016) (Walker, Schelle and Jucker, 2016)
TICN1			X		0,48	(Barrera-Ocampo et al., 2016)
ADGRB2				X	0,41	(Duman, Tu and Tolias, 2016) (Kee et al., 2002)
NPTXR				X	0,49	(Yin et al., 2009) (Bilousova et al., 2015)
B2MG			X		0,51	(Stoppini and Bellotti, 2015) (Rembach et al., 2015)
ISLR				X	0,60	(Sollner and Wright, 2009) (Nagasawa et al., 1997)
IBP6	X				0,64	(Chesik et al., 2004) (Ray et al., 2007) (Klinman and Holzbaaur, 2015)
NDELI				X	0,72	(Pei et al., 2014) (Shim et al., 2008) (Klinman and Holzbaaur, 2015)
KLK6			X		0,61	(Ashby, Kehoe and Love, 2010)

76| Material suplementar

Tabela Suplementar S.2 – Continuação.

Proteína	Relação com a patologia de Alzheimer				Valores de variação	Referências
	Neuroinflamação	stress oxidativo	Relação com β A	Outras		
HEMO	X	X			1,21	(Ringman et al., 2012) (Tolosano et al., 2010) (Castano et al., 2006)
CYTC			X		0,58	(Deng et al., 2001)
HVI46	X				1,49	(Stoppini et al., 1995)
TTHY			X		0,60	(Ribeiro et al., 2012) (Castano et al., 2006)
APOD	X	X			0,65	(Dassati, Waldner and Schweigreiter, 2014) (Li et al., 2015)
MIME		X			0,61	(Ma et al., 2011)
LAMP2			X		0,68	(Murphy et al., 2015) (Armstrong et al., 2014) (Ma et al., 2017)
PEBP4				X	0,69	(He et al., 2016)

Para a realização dos diferentes grupos de estudo na análise PCA e para o estudo das proteínas selecionadas, foram utilizadas proteínas com valor de $p < 0,05$. A lista dessas proteínas com os respectivos valores de quantificação, variação e valor-p de cada grupo, estão apresentados na Tabela suplementar S3 à S6.

Tabela Suplementar S.3 – Proteínas alteradas na comparação entre as duas patologias (DA Vs. DCL).

Número de identificação	Proteína	Doentes de Alzheimer																	Doentes de DCL											DA/DCL	valor de p			
		AF63	AF66	AF67	AF71	AF72	AF72*	AF73	AF77	AF79	AM50	AM55	AM55*	AM71	AM77	MF54	MF57	MF58	MF63	MF64	MF65	MF67	MF76	MF83	MM56	MM58	MM63	MM64	MM70			MM72	MM72*	
Q08629	TICN1	2.84E-05	1.85E-05	1.06E-05	0.00018	2.29E-05	0.00024	0.00023	1.85E-05	2.66E-05	1.74E-05	1.89E-05	2.68E-05	2.07E-05	4.43E-05	3.72E-05	0.000056	5.21E-05	3.82E-05	4.19E-05	6.15E-05	0.000053	4.36E-05	3.74E-05	4.76E-05	2.43E-05	2.63E-05	5.28E-05	4.86E-05	0.48	1.6E-06			
P04156	PRIO	0.000109	0.000035	3.02E-05	0.000056	6.04E-05	5.98E-05	7.13E-05	5.78E-05	5.74E-05	5.67E-05	0.00006	5.66E-05	7.96E-05	0.000027	7.03E-05	7.18E-05	9.69E-05	0.000188	9.72E-05	0.000125	0.000156	0.00012	0.000125	0.000156	0.000128	9.87E-05	0.000161	6.64E-05	0.000258	8.59E-05	0.47	3.74E-06	
Q9GZM8	NDEL1	0.000168	0.000123	0.000155	0.000135	0.000154	0.000155	0.000114	0.000166	0.000129	0.000163	0.000125	0.000168	0.000219	0.000174	0.000192	0.000173	0.000196	0.000173	0.000196	0.00017	0.000155	0.000233	0.000223	0.000266	0.000212	0.000168	0.000224	0.000155	0.000235	0.72	5.03E-06		
P05452	ITSN	1.92E-05	1.84E-05	2.01E-06	2.66E-05	2.88E-05	2.52E-05	4.84E-05	1.24E-05	3.27E-06	2.59E-05	1.31E-05	1.56E-05	5.36E-05	2.73E-05	2.57E-05	0.000142	0.000027	7.15E-05	0.000103	8.16E-05	0.000147	4.07E-05	0.000176	2.91E-05	5.33E-05	0.000084	0.26	1.6E-05					
I01498	ISLR	3.32E-05	1.83E-05	2.21E-05	2.67E-05	2.07E-05	1.52E-05	1.75E-05	2.88E-05	3.05E-05	2.09E-05	1.63E-05	1.71E-05	4.28E-06	1.54E-05	2.76E-05	3.04E-05	4.07E-05	3.24E-05	2.95E-05	0.000035	3.29E-05	4.47E-05	3.64E-05	2.54E-05	4.11E-05	2.07E-05	4.04E-05	3.36E-05	4.22E-05	3.71E-05	0.60	2.82E-05	
Q8WVX2	SCG3	0.000295	9.96E-05	5.46E-05	9.09E-05	0.000157	0.000113	0.00012	0.00013	0.000251	0.000261	0.000144	0.000102	0.000219	2.95E-05	0.000215	0.000243	0.000433	0.00043	0.000264	0.000371	0.000486	0.000355	0.000277	0.000268	0.000274	0.000206	0.000434	0.000121	0.000509	0.000401	0.45	5.97E-05	
P61769	B2MG	0.000121	0.000156	0.000349	0.000179	0.000113	0.000154	0.00014	0.000194	0.00018	0.00014	0.000179	0.000236	8.89E-05	0.000223	0.000228	0.000293	0.000546	0.000175	0.000222	0.000442	0.000396	0.000163	0.000399	0.000252	0.000371	0.000676	0.000285	0.000281	0.000443	0.000435	0.51	1.26E-04	
P24592	IBP6	0.000178	0.000194	0.00015	0.000148	0.000148	0.000127	0.000147	0.000141	0.000187	0.000224	0.000227	0.000134	0.000261	0.0002	0.000176	0.00017	0.000318	0.000285	0.000258	0.000244	0.000253	0.000279	0.000234	0.000384	0.000247	0.000339	0.000356	0.000241	0.64	1.32E-04			
Q7Z3B1	NEGR1	0.000139	9.25E-05	6.15E-05	6.28E-05	0.000098	9.78E-05	9.32E-05	0.000142	0.000122	0.000149	4.88E-05	0.00013	0.000131	0.00011	0.000181	0.000205	0.000175	0.000205	0.000223	0.000206	0.000104	0.000136	0.000102	0.000191	9.59E-05	0.000102	0.000222	0.000142	0.58	0.01			
Q04216	THY1	0.000671	0.000353	0.000134	0.000305	0.000434	0.000476	0.00049	0.000434	0.000429	0.000461	0.000441	0.000418	0.00043	0.000471	0.000531	0.000479	0.000823	0.001086	0.000729	0.001401	0.000759	0.001075	0.000525	0.000327	0.000441	0.000444	0.000627	0.000376	0.000897	0.000552	0.55	0.001	
P02766	THY	0.017327	0.015893	0.015496	0.022357	0.018072	0.012986	0.013358	0.014254	0.016271	0.009797	0.006297	0.016758	0.014654	0.026655	0.02149	0.015428	0.023994	0.013245	0.022935	0.031147	0.018277	0.021456	0.041546	0.025126	0.014644	0.04163	0.016524	0.03004	0.026529	0.60	0.001		
P01019	ANGT	0.00628	0.005848	0.004218	0.004319	0.005009	0.004307	0.005632	0.006097	0.006382	0.009323	0.004033	0.006373	0.004506	0.004723	0.006577	0.009383	0.007951	0.008505	0.007951	0.012847	0.01313	0.006133	0.008664	0.006342	0.005442	0.007979	0.007821	0.010502	0.008022	0.67	0.001		
P39060	CO1A1	3.18E-05	3.83E-05	2.88E-05	2.48E-05	3.82E-05	2.56E-05	3.14E-05	3.95E-05	0.000043	2.35E-05	3.42E-05	6.67E-06	2.61E-05	3.58E-05	3.42E-06	5.31E-05	6.06E-05	5.23E-05	0.000056	5.76E-05	4.15E-05	4.08E-05	4.44E-05	0.000047	3.86E-05	5.05E-05	2.55E-05	7.47E-05	4.59E-05	0.66	0.001		
I01492	OPCM	0.000111	6.54E-05	3.38E-05	5.99E-05	7.23E-05	8.31E-05	9.13E-05	0.000103	0.000081	0.000109	0.000087	0.000045	0.000109	4.17E-05	9.87E-05	0.000122	0.000166	0.000238	0.000126	0.000221	0.000205	0.000243	0.000138	7.52E-05	0.000188	5.17E-06	0.000217	6.61E-05	0.000184	0.000148	0.51	0.001	
Q60241	AGRB2	3.56E-05	9.26E-06	2.83E-06	2.18E-05	5.79E-06	9.46E-06	1.27E-05	1.6E-06	1.41E-05	3.67E-06	2.42E-06	9.69E-06	1.08E-05	9.4E-06	0.000014	1.42E-05	4.41E-05	0.000015	5.09E-05	3.74E-05	3.99E-05	2.46E-05	3.82E-05	3.13E-05	1.05E-05	4.02E-05	8.81E-06	2.52E-05	3.24E-06	0.41	0.001		
P35908	K2Z2	0.000458	0.000152	0.000147	0.000207	0.000186	0.000205	0.00025	0.000294	0.000567	0.0004	0.000804	0.000436	0.000366	0.000524	0.000525	0.000604	0.001366	0.000286	0.000841	0.000611	0.000901	0.000368	0.000531	0.000454	0.000698	0.000621	0.000664	0.000621	0.000664	0.56	0.001		
P20774	MME	0.000891	0.000552	0.000337	0.000597	0.000491	0.000308	0.000357	0.000479	0.000591	0.000461	0.000389	0.000256	0.000717	0.000325	0.000749	0.000775	0.001095	0.000645	0.000541	0.000685	0.000831	0.000998	0.000981	0.001091	0.000881	0.000443	0.000158	0.00036	0.000143	0.000995	0.61	0.001	
P08185	CSG	0.000287	0.000376	0.0004	0.000272	0.000218	0.000259	0.000274	0.000224	0.000193	0.000166	0.00033	0.000253	0.000285	0.000271	0.000184	0.000168	0.000156	0.000215	0.00025	0.000167	0.000245	0.000165	0.000255	0.000195	0.000215	0.000214	0.000213	0.000287	0.000182	0.000138	1.32	0.001	
P13473	LAMP2	0.000252	0.000305	0.000117	0.000183	0.000254	0.000246	0.000254	0.000247	0.000294	0.000253	0.000247	0.000253	0.000224	0.000146	0.000238	0.000221	0.000276	0.000395	0.000309	0.000484	0.00041	0.000457	0.000366	0.000256	0.000271	0.000164	0.000333	0.000234	0.000342	0.000348	0.88	0.002	
I014515	SPR1	0.000771	0.000543	0.000471	0.000517	0.000669	0.000551	0.0006	0.000721	0.000915	0.000928	0.000628	0.000797	0.000981	0.000545	0.001185	0.001044	0.001433	0.001662	0.000934	0.001067	0.001139	0.000952	0.000685	0.000698	0.000695	0.000643	0.000695	0.000626	0.000976	0.001307	0.69	0.002	
P48058	GRII4	2.48E-05	3.95E-05	2.05E-05	7.35E-06	3.41E-05	3.27E-05	3.45E-05	0.000025	5.36E-05	3.87E-05	4.03E-05	1.33E-05	3.81E-05	2.39E-05	4.68E-05	3.94E-05	7.08E-05	4.84E-05	0.000055	6.44E-05	0.000083	6.88E-05	5.74E-05	3.18E-05	0.000046	1.34E-05	4.94E-05	4.18E-06	6.46E-05	5.77E-05	0.58	0.002	
Q9P121	NTR1	0.000145	3.79E-05	6.54E-05	6.24E-05	0.000104	8.97E-05	8.87E-05	0.000203	0.000164	0.000129	7.02E-05	0.000172	5.91E-05	0.000149	0.000177	0.00023	0.000291	0.000177	0.000218	0.000249	0.000241	0.000108	9.98E-05	0.000126	0.000185	9.86E-05	0.000197	0.000147	0.65	0.002			
P90459	ICERU	0.002098	0.003427	0.004737	0.002146	0.002136	0.004053	0.00421	0.002878	0.002672	0.001521	0.002686	0.002794	0.002891	0.003381	0.002158	0.002327	0.00205	0.002244	0.001635	0.001919	0.002229	0.002116	0.002028	0.002268	0.00191	0.002254	0.002161	0.001492	0.001771	1.43	0.002		
O75144	KO5L	5.48E-05	3.85E-05	0.000022	3.02E-06	4.47E-05	4.52E-05	4.23E-05	0.000056	6.62E-05	4.48E-05	1.55E-05	5.28E-05	5.74E-05	4.33E-05	5.02E-05	0.000063	6.39E-05	6.72E-05	0.000086	0.000108	9.44E-05	0.00011	4.57E-05	3.12E-05	5.13E-05	3.93E-05	7.21E-05	4.86E-05	8.94E-05	6.87E-05	0.60	0.002	
P04180	LCAT	2.39E-05	1.68E-05	1.11E-05	9.32E-06	8.9E-06	1.55E-05	0.000016	1.74E-05	2.77E-05	2.72E-05	3.54E-05	1.89E-05	1.78E-05	1.29E-05	4.28E-05	1.94E-05	0.000029	2.31E-05	2.21E-05	1.63E-05	3.25E-05	4.05E-05	3.72E-05	3.15E-05	2.45E-05	9.31E-06	3.88E-05	2.48E-05	3.69E-05	4.47E-05	0.62	0.002	
Q99574	NEUS	0.000132	0.000102	5.28E-05	9.34E-05	0.000103	9.45E-05	9.35E-05	0.000107	0.000109	9.25E-05	3.26E-05	0.000114	8.53E-05	9.83E-05	0.000119	0.000127	0.000218	0.000208	0.000251	0.000143	0.000109	0.000208	0.000251	0.000153	0.000143	0.000109	6.81E-05	0.000165	0.000136	0.000186	0.000123	0.63	0.002
Q95596	PEBP4	0.																																

Tabela Suplementar S.3 – Continuação.

Número de	Proteína	Doentes de Alzheimer															Doentes de DCL												DA/DCL	valor de p			
		AF63	AF66	AF67	AF71	AF72	AF72*	AF73	AF77	AF79	AM50	AM55	AM55*	AM71	AM77	MF54	MF57	MF58	MF63	MF64	MF65	MF67	MF76	MF78	MM56	MM58	MM63	MM64			MM70	MM72	MM72*
P3695	PEDF	0.005468	0.005831	0.004392	0.004128	0.004734	0.004662	0.004787	0.005239	0.007569	0.007952	0.005849	0.006451	0.008483	0.00508	0.005629	0.007478	0.00721	0.008552	0.007374	0.008334	0.007577	0.007125	0.00485	0.005657	0.004813	0.006893	0.007114	0.006366	0.00828	0.006526	0.84	0.028
P78324	SHPS1	0.000387	0.000387	0.000169	0.000221	0.000404	0.000329	0.000339	0.000461	0.000369	0.000618	0.000522	0.000403	0.000582	0.000157	0.000477	0.000548	0.000685	0.000657	0.00071	0.000957	0.000475	0.001049	0.000482	0.00024	0.000253	0.000464	0.000529	0.000283	0.000627	0.000255	0.70	0.031
Q96KN2	CNDP1	0.002159	0.001963	0.00125	0.00162	0.002472	0.001877	0.001847	0.001961	0.002789	0.002574	0.002072	0.001808	0.002588	0.001185	0.001887	0.002915	0.002963	0.003646	0.002593	0.003736	0.004546	0.003669	0.002241	0.001695	0.001475	0.001666	0.003679	0.001503	0.00416	0.002599	0.72	0.031
P02790	HEMO	0.008901	0.014582	0.016691	0.011302	0.006091	0.013099	0.013493	0.011254	0.01194	0.008216	0.01034	0.008911	0.011338	0.013481	0.007903	0.007035	0.006264	0.006083	0.007219	0.00825	0.009247	0.008862	0.011887	0.013413	0.010384	0.008868	0.009726	0.016527	0.010328	0.008373	1.21	0.031
P43652	AFAM	0.000797	0.00125	0.001175	0.000744	0.000809	0.001336	0.001356	0.000769	0.000772	0.000614	0.000854	0.000827	0.000699	0.001239	0.000743	0.000519	0.000565	0.000509	0.000511	0.000076	0.000662	0.000713	0.000782	0.00097	0.000776	0.000899	0.000784	0.00007	0.000621	0.000747	1.31	0.031
Q9ULB1	NRX1A	6.91E-05	5.21E-05	3.45E-05	2.31E-05	2.84E-05	7.26E-05	7.34E-05	7.41E-05	0.000091	0.000117	9.43E-05	5.31E-05	0.000108	3.77E-05	7.78E-05	8.49E-05	0.000176	0.00018	8.68E-05	0.000164	0.000141	0.00014	3.7E-05	4.21E-05	6.71E-05	3.85E-05	8.53E-05	3.99E-05	0.000118	5.94E-05	0.69	0.034
Q14118	DAG1	4.94E-05	3.43E-05	3.12E-05	0.000047	2.96E-05	5.34E-05	5.72E-05	4.23E-05	6.46E-05	2.17E-05	8.46E-06	3.01E-05	4.48E-05	3.62E-05	4.23E-05	4.15E-05	5.99E-05	7.41E-05	4.22E-05	5.23E-05	8.75E-05	8.02E-05	6.37E-05	7.01E-05	6.08E-05	1.16E-05	0.000003	3.99E-05	0.000118	5.94E-05	0.69	0.034
P16870	CBPE	0.000239	0.000266	0.000206	0.000174	0.000307	0.00024	0.000259	0.000328	0.00062	0.000541	0.000359	0.000372	0.000542	0.000193	0.000404	0.000464	0.000621	0.000504	0.000467	0.000476	0.000665	0.000592	0.00027	0.000402	0.000286	0.000122	0.000592	0.000276	0.000504	0.000673	0.74	0.034
Q13332	PTPRS	5.73E-05	3.47E-05	2.45E-05	3.43E-05	3.76E-05	4.18E-05	4.02E-05	4.47E-05	5.07E-05	3.58E-05	2.88E-05	1.93E-05	5.36E-05	2.16E-05	3.15E-05	4.98E-05	5.23E-05	9.41E-05	4.29E-05	0.000063	8.34E-05	6.95E-05	3.99E-05	3.53E-05	4.31E-05	2.69E-05	5.17E-05	2.72E-05	5.87E-05	5.65E-05	0.73	0.038
P16916	NPC2	0.000111	0.000128	8.23E-05	0.000109	5.63E-05	0.000181	0.00022	0.000243	0.000234	0.000136	6.73E-05	7.33E-05	0.000189	9.67E-05	0.000182	0.000163	0.000203	0.000226	0.00013	0.000217	0.000203	0.000202	0.000144	0.000209	0.000189	7.13E-05	0.00022	0.000114	0.000248	0.000249	0.74	0.038
P23471	PTPRZ	0.000021	0.000188	0.000106	8.86E-05	0.000154	0.000189	0.000181	0.000218	0.000298	0.000272	0.000265	0.000232	0.000305	0.000113	0.000241	0.000291	0.000313	0.000383	0.000312	0.000323	0.000388	0.000372	0.000196	0.000162	0.000182	0.000156	0.000207	0.000149	0.000307	0.000285	1.76	0.038
P10108	ANT3	0.00343	0.00552	0.005879	0.003924	0.00351	0.003796	0.00386	0.00338	0.003916	0.003783	0.006185	0.004631	0.004925	0.005282	0.004064	0.003819	0.003573	0.003398	0.004556	0.003032	0.003515	0.002746	0.003998	0.003465	0.00342	0.005473	0.003048	0.003691	0.003859	1.19	0.041	
P05067	A4	0.000684	0.000468	0.000302	0.000259	0.000514	0.000532	0.000536	0.000608	0.000586	0.001348	0.001046	0.000475	0.000698	0.000304	0.000904	0.000708	0.001707	0.001034	0.000628	0.000167	0.001258	0.001264	0.000551	0.000336	0.0006	0.000521	0.000693	0.00058	0.000757	0.01023	0.72	0.043
Q9NC79	CRAC1	0.000676	0.000486	0.000374	0.000472	0.000531	0.000537	0.000578	0.000596	0.000653	0.000684	0.000714	0.000421	0.000893	0.000435	0.000632	0.000773	0.001125	0.001433	0.000765	0.000891	0.001061	0.001069	0.000551	0.000411	0.000387	0.00061	0.000722	0.000412	0.000511	0.000653	0.74	0.043
P51693	APLP1	0.001242	0.00065	0.000407	0.000558	0.000615	0.000723	0.000711	0.00077	0.000902	0.000977	0.000756	0.000518	0.001223	0.000461	0.000609	0.000715	0.000986	0.001368	0.000944	0.001391	0.001686	0.001558	0.001012	0.000798	0.000808	0.000597	0.001155	0.000658	0.001223	0.000591	0.74	0.043
P26679	FIBG	0.000507	0.000298	0.000278	0.000262	0.001331	0.001423	0.000498	0.000306	0.000943	0.002467	0.000917	0.000631	0.001133	0.000609	0.000526	0.000605	0.000605	0.000891	0.000829	0.00038	0.000714	0.000408	0.000446	0.000656	0.000396	0.000662	0.000782	1.78	0.043			
Q9UBP4	DKK3	0.000185	0.000768	0.000716	0.000968	0.001099	0.001018	0.001156	0.001185	0.001704	0.001266	0.001044	0.000818	0.001864	0.000572	0.001064	0.001385	0.001477	0.002286	0.0001241	0.001743	0.002524	0.02601	0.001755	0.000995	0.001195	0.000752	0.001741	0.000949	0.00239	0.001129	0.72	0.047
P13591	NAM1	0.001079	0.000805	0.000478	0.000472	0.000922	0.000999	0.001101	0.001303	0.001348	0.001595	0.00114	0.000834	0.001876	0.000577	0.001174	0.001432	0.001959	0.002575	0.001467	0.001896	0.001846	0.001845	0.000967	0.000759	0.000913	0.001061	0.001259	0.000702	0.001529	0.001505	0.73	0.047
Q9Y6N7	ROBO1	3.42E-05	2.34E-05	1.13E-05	1.09E-05	2.25E-05	1.88E-05	1.55E-05	2.95E-05	3.06E-05	1.94E-05	2.67E-05	9.95E-06	3.56E-05	0.000014	2.37E-05	2.35E-05	3.06E-05	0.000399	0.000022	2.76E-05	3.78E-05	3.96E-05	2.62E-05	1.73E-05	2.34E-05	0.000026	2.69E-05	1.94E-05	3.47E-05	2.83E-05	0.77	0.047
Q9Y646	CBQO	0.000135	0.000141	8.97E-05	8.2E-05	0.000135	8.76E-05	8.2E-05	0.000114	0.000105	0.000157	0.000183	0.000151	7.83E-05	0.000187	0.000159	0.000124	0.000144	0.000122	0.000234	0.002008	0.000122	0.000112	0.000146	0.000125	0.000121	0.000146	0.000125	0.000146	0.000118	0.00018	0.78	0.047
P01764	HV303	0.000259	0.000464	0.001061	0.00063	0.000297	0.000537	0.000546	0.00109	0.001025	0.000594	0.00092	0.000526	0.000577	0.000797	0.001292	0.000247	0.00034	0.000241	0.000312	0.00035	0.000232	0.000419	0.000597	0.000488	0.000342	0.000487	0.000379	0.00052	0.000314	0.000493	1.41	0.047
Q96G70	PGCB	0.000093	0.000895	0.000461	0.000767	0.000791	0.000811	0.000911	0.001149	0.001045	0.001357	0.0014	0.000796	0.000954	0.000517	0.001097	0.001113	0.001885	0.001248	0.00108	0.001804	0.001798	0.001839	0.000763	0.000721	0.000831	0.0006	0.001137	0.00082	0.001292	0.001144	0.72	0.052
Q92859	NEO1	0.000292	0.000171	0.000113	0.000106	0.00014	0.000171	0.000168	0.000187	0.000273	0.000213	0.000199	0.000184	0.000297	0.000111	0.000151	0.000197	0.000272	0.000383	0.000249	0.00033	0.000401	0.000343	0.000205	0.000148	0.000175	0.000138	0.000284	0.000146	0.000291	0.000223	0.74	0.052
Q13449	LSAMP	0.000252	0.000152	8.06E-05	0.000112	0.000222	0.000135	0.000178	0.000132	0.000277	0.000318	0.000312	0.000184	0.000249	0.000111	0.000148	0.000336	0.000305	0.000478	0.000339	0.000435	0.000285	0.000437	0.000244	0.000175	0.000121	0.000131	0.000321	9.11E-05	0.00361	0.000241	0.70	0.052
P63261	ACTG	0.000182	0.000106	0.00025	0.000123	0.000154	0.00012	0.000123	0.00018	0.000202	0.000186	0.000204	0.000166	0.000254	0.000178	0.000126	0.000164	0.000297	0.000262	0.000275	0.00046	0.000284	0.000284	0.000197	0.000142	9.78E-05	0.00012	0.000151	0.000209	0.000191	0.000215	0.88	0.064
Q16270	IBP7	6.62E-05	6.78E-05	5.1E-05	7.94E-05	9.75E-05	5.02E-05	6.58E-05	0.000096	0.000099	0.000118	4.02E-05	0.00012	0.000165	8.66E-05																		

Tabela Suplementar S.3 – Continuação.

Número de	Proteína	Doentes de Alzheimer															Doentes de DCL												DA/DCL	valor de p					
		AF63	AF66	AF67	AF71	AF72	AF72*	AF73	AF77	AF79	AM50	AM55	AM55*	AM71	AM77	MF54	MF57	MF58	MF63	MF64	MF65	MF67	MF76	MF83	MM56	MM58	MM63	MM64			MM70	MM72	MM72*		
O14594	NCAN	0.000364	0.000218	0.000113	0.000145	0.000189	0.000188	0.000183	0.000261	0.000224	0.000414	0.000287	0.00014	0.000298	0.000104	0.000175	0.000205	0.000273	0.000348	0.000261	0.000536	0.000483	0.000506	0.000228	0.000118	0.000233	0.00019	0.000252	0.000178	0.000415	0.000157	0.78	0.208		
O15031	PLXB2	2.99E-05	2.83E-05	2.13E-05	1.83E-05	3.96E-05	3.14E-05	1.1E-06	0.000029	4.58E-05	2.31E-05	5.18E-05	2.31E-05	5.05E-05	2.55E-05	2.87E-05	0.000037	3.22E-05	2.32E-05	3.74E-05	3.58E-05	3.62E-05	4.77E-05	3.59E-05	0.000031	3.18E-05	8.19E-06	3.59E-05	2.37E-05	3.51E-05	5.09E-05	0.89	0.208		
P08603	CFAH	0.000764	0.001246	0.001605	0.00074	0.000994	0.001291	0.001292	0.001444	0.001487	0.001153	0.001262	0.001295	0.001477	0.001014	0.001066	0.001193	0.00136	0.001354	0.001109	0.001142	0.001153	0.001159	0.000887	0.000858	0.000825	0.000875	0.00095	0.001495	0.001282	0.001167	1.09	0.208		
P29622	KAIN	4.86E-05	8.55E-05	9.47E-05	7.79E-05	0.000036	8.98E-05	0.000111	4.39E-05	6.18E-05	4.95E-05	5.86E-05	4.63E-05	0.000066	0.000112	5.44E-05	4.27E-05	4.25E-05	3.97E-05	6.95E-05	5.18E-05	0.000067	5.07E-05	5.15E-05	8.85E-05	6.34E-05	7.05E-05	4.61E-05	6.39E-05	1.24	0.217				
P01834	IGKC	0.005714	0.001364	0.019686	0.016542	0.008946	0.013355	0.014142	0.007883	0.006374	0.007444	0.026438	0.009359	0.011207	0.019095	0.005976	0.007999	0.009141	0.007114	0.007896	0.006454	0.006368	0.012658	0.015001	0.012354	0.013544	0.013808	0.006155	0.0195	0.00793	0.008699	1.28	0.224		
P00748	FA12	9.63E-05	0.000127	0.000231	0.000131	7.12E-05	9.56E-05	9.99E-05	0.000108	0.000109	0.000103	2.46E-06	0.000139	0.000127	7.38E-05	7.15E-05	0.000095	4.2E-06	7.81E-05	6.42E-05	8.75E-05	0.000115	0.000124	0.000103	0.000114	0.000114	0.000114	1.27E-06	0.000117	0.000115	1.26	0.234			
G0Ux71	PADC2	5.68E-05	4.19E-05	3.72E-05	3.57E-05	5.56E-05	6.21E-05	5.81E-05	9.81E-05	0.000114	7.77E-05	7.06E-05	4.93E-05	7.36E-05	4.85E-05	6.93E-05	6.69E-05	8.89E-05	0.000104	0.000139	6.61E-05	4.91E-05	0.000093	6.78E-05	4.45E-05	6.35E-05	3.66E-05	6.37E-05	5.05E-05	0.000104	8.83E-05	0.88	0.240		
P00736	C1R	0.000098	0.000131	0.000116	0.000102	0.000112	0.000118	6.74E-05	0.00019	0.000219	0.000099	0.000156	0.000108	0.000264	8.35E-05	0.000145	0.000157	0.000179	0.000182	0.000139	0.000177	0.000136	0.000158	0.000124	0.000116	0.000109	0.000106	0.000129	0.000153	6.08E-05	0.000144	0.97	0.240		
P18135	KV312	0.000524	0.000686	0.001286	0.001044	0.000552	0.000742	0.000759	8.48E-05	0.000281	0.000564	0.00195	0.000781	0.000876	0.001101	0.000122	0.000496	0.000613	0.000406	0.000444	0.000415	0.000633	0.000907	0.000861	0.000604	0.000702	0.000108	0.00037	0.001587	0.000196	0.000726	1.26	0.240		
Q41180	FIL1L	0.000971	0.000966		0.000946	0.000972	0.000761	0.000734	0.000369	0.000785	0.000869	0.000332	0.00079	0.000587	0.000445	0.000983	0.000876	0.00067	0.000713	0.000728	0.000563	0.00068	0.000574	0.000682	0.000564	0.000611	0.000661	0.000572	0.000454	0.000637	0.000653	1.08	0.249		
P01960	IGHG3	5.93E-05	0.00021	0.000195	0.000125	0.000261	0.00016	0.00016	6.24E-05	0.000174			0.000507	0.000476	0.000564	0.000408	0.000319	0.000708	0.001015	0.001352	0.000751	0.001837	0.000868	0.001166	0.000755	0.000704	0.000668	0.000668	0.002137	0.000547	0.002048	0.000932	0.000914	1.73	0.251
P06727	APOA4	0.000608	0.000642	0.000758	0.000731	0.000395	0.000737	0.000727	0.000598	0.000677			0.001364	0.000919	0.000708	0.001015	0.001352	0.000751	0.001837	0.000868	0.001166	0.000755	0.000704	0.000668	0.000668	0.002137	0.000547	0.002048	0.000932	0.000914	1.73	0.251			
P05660	SCC1	3.36E-05	0.000014	7.64E-06	1.08E-05	0.000031	1.58E-06	1.61E-05	3.09E-05	1.31E-06	5.99E-05	5.29E-05	5.17E-05	4.87E-05	1.44E-05	4.26E-05	3.03E-05	5.87E-05	2.88E-05	2.25E-05	2.61E-05	0.000029	3.29E-05	0.000023	1.19E-06	5.09E-05	0.000039	2.81E-05	4.19E-05	5.54E-05	0.73	0.257			
Q16610	ECM1	0.000154	0.000125	9.92E-05	0.000105	0.000114	0.000136	0.000113	0.000141	0.000144	0.000163	0.000146	0.000141	0.000162	0.000111	0.000122	8.89E-05	0.000139	0.000219	0.000188	0.000307	0.000255	0.000303	0.000126	9.56E-05	0.000121	0.000228	0.000131	0.000173	0.000195	0.000141	0.75	0.257		
P02649	AP04	0.014428	0.009712	0.004908	0.001501	0.011728	0.011747	0.011741	0.017113	0.024267	0.027346	0.014516	0.024559	0.006551	0.007128	0.020212	0.026288	0.019704	0.024406	0.017101	0.022889	0.012906	0.007381	0.007428	0.012087	0.015138	0.009279	0.021532	0.022075	0.84	0.257				
P02748	CO9	0.000229	0.000728	0.001	0.000125	0.000378	0.000609	0.000692	0.000496	0.000402	0.000538	0.000832	0.000915	0.000934	0.000923	0.00039	0.000345	0.000566	0.000538	0.00064	0.000241	0.000422	0.000506	0.00077	0.000167	0.000413	0.000862	0.000428	0.000189	0.000265	0.000574	1.20	0.257		
P07477	TRY1	0.004674	0.001934	0.001939	0.001586	0.001787	0.001838	0.002747	0.002715	0.004582			0.003384	0.003405	0.003405	0.004695	0.005639	0.00267	0.00044	0.004548	0.005313	0.002926	0.001671	0.001389	0.00179	0.003297	0.000395	0.000409	0.003788	0.85	0.274				
P01598	KV106	2.03E-05	0.000067	7.7E-05	7.11E-05	5.05E-05	4.49E-05	4.18E-05	6.08E-05	2.77E-05	4.61E-05	0.000105	8.12E-05	0.000173	7.66E-05	6.03E-05	6.85E-05	1.79E-05	7.72E-05	4.13E-05	6.69E-05	6.67E-05	0.000116	9.83E-05	0.000121	0.000153	5.92E-05	0.000141	6.46E-05	0.000134	0.80	0.275			
P02745	C1QA	2.47E-05	0.000036	3.82E-05	2.32E-05	3.05E-05	4.76E-05	7.99E-05	4.35E-05	0.000069	7.68E-05	6.13E-05	8.94E-05	3.81E-05	4.55E-05	6.07E-05	5.5E-06	5.28E-05	2.55E-05	4.06E-05	2.46E-05	2.08E-05	2.23E-05	3.89E-05	4.54E-05	3.89E-05	5.45E-05	3.98E-05	1.31	0.275					
P02647	APOA1	0.008316	0.00953	0.011032	0.01031	0.008574	0.009656	0.010108	0.007569	0.00666	0.011276	0.017603	0.009704	0.011085	0.00918	0.01017	0.010142	0.008231	0.011329	0.009022	0.010111	0.007741	0.009214	0.009745	0.007754	0.006669	0.007127	0.009896	1.14	0.280					
P04004	VINC	0.000184	0.000333	0.000469	0.000221	0.000207	0.000349	0.00032	0.000298	0.000186	0.000208	0.00062	0.000592	0.000303	0.000343	0.000459	0.001075	0.000381	0.000432	0.000382	0.00029	0.000215	0.000233	0.000303	0.000303	0.000225	0.000228	0.000336	0.00054	0.88	0.284				
P06396	GLS	0.003467	0.003727	0.003713	0.002737	0.003543	0.0034	0.003493	0.004077	0.005212	0.003907	0.005496	0.002713	0.007185	0.003423	0.00339	0.003963	0.004358	0.005629	0.004311	0.003649	0.004846	0.004607	0.003416	0.003527	0.003116	0.003814	0.003725	0.004045	0.005968	0.004338	0.96	0.294		
PGC095	LAC2	0.000315	0.000681	0.001041	0.001233	0.000725	0.000668	0.000318	0.000429	0.000688	0.001718	0.000623	0.000917	0.00065	0.000344	0.000365	0.000585	0.000585	0.000396	0.000363	0.000608	0.000742	0.000097	0.000121	0.000578	0.000137	0.000578	0.000081	0.000449	0.000531	1.15	0.294			
P08123	CO1A2	9.59E-06	5.36E-05	5.24E-05	2.32E-05	5.21E-05	3.71E-05	0.00002	4.97E-05	5.32E-05	0.000107	0.00011	0.000112	0.000112	6.43E-05	8.67E-05	6.64E-05	0.000124	8.85E-05	0.000095	7.48E-05	6.85E-05	4.44E-05	2.82E-05	0.000023	4.48E-05	0.000107	6.07E-05	7.68E-05	6.27E-05	5.49E-05	0.88	0.313		
P02746	C1QB	3.74E-05	6.53E-05	5.72E-05	3.73E-05	6.86E-05	0.000051	5.57E-05	8.44E-05	6.98E-05	5.39E-05	7.12E-05	6.11E-05	9.17E-05	4.76E-05	6.85E-05	8.15E-05	8.54E-05	0.000081	7.03E-05	8.23E-05	4.62E-05	7.70E-05	5.15E-05	4.41E-05	5.16E-05	0.000171	6.19E-05	6.08E-05	0.000091	0.000087	0.91	0.313		
P02753	RET1	0.000164	0.000261	0.000258	0.000289	0.000172	0.000305	0.000329	0.000166	0.000183	0.000166	0.000259	0.000236	0.000314	0.000188	0.000103	0.000163	0.000106	0.000217	0.000171	0.00011	0.0000238	0.000203	0.000197	0.000277	0.000195	0.000224	0.000227	0.000316	0.000304	0.000183	1.15	0.313		
P27169	PN1	7.74E-05	6.32E-05	0.000135	0.000175	0.000203	9.22E-05	9.73E-05																											

Tabela Suplementar S.4 - Proteínas alteradas na comparação entre os géneros feminino e masculino na doença de Alzheimer.

Número de Identificação	Proteína	Alzheimer Feminino									Alzheimer Masculino					Fem/Masc	p-value
		AF63	AF66	AF67	AF71	AF72	AF722	AF73	AF77	AF79	AM50	AM55	AM55*	AM71	AM77		
P04264	K2C1	0,00303	0,00153	0,00096	0,00169	0,00331	0,00135	0,00135	0,00092	0,00194	0,00341	0,00363	0,0046	0,00352	0,00317	0,4878086	0,002
P08123	CO1A2	9,6E-06	5,4E-05	5,2E-05	2,9E-05	5,2E-05	3,7E-05	0,00002	5E-05	5,3E-05	0,00011	0,00011	0,00011	0,00011		0,3596775	0,003
Q14393	GAS6	2,2E-06	2E-05	9,9E-06	3,5E-06	2,6E-06	2E-05	1,9E-05	2,5E-05	2,6E-06	5E-05	5E-05	5,9E-05	2,3E-05	2,2E-05	0,2849683	0,004
P06727	APOA4	0,00091	0,00064	0,00076	0,00073	0,00095	0,00074	0,00073	0,0006	0,00068	0,0017	0,00158	0,00136	0,00188	0,00082	0,5085412	0,004
P01860	IGHG3	5,9E-05	0,00021	0,0002	0,00013	0,00026	0,00016	0,00016	6,2E-05	0,00017	0,00123	0,00051	0,00048	0,00056	0,00019	0,2630427	0,007
P02452	CO1A1	0,0001	0,00016	0,00017	7,7E-05	0,00024	0,00015	0,00016	0,00024	0,00024	0,00046	0,00056	0,0007	0,00048	0,00017	0,3584139	0,007
P07477	TRY1	0,00467	0,00193	0,00194	0,00159	0,00332	0,00179	0,00184	0,00275	0,00272	0,00528	0,00458	0,00963	0,00338	0,00341	0,4765317	0,007
P02774	VTDB	0,00626	0,00527	0,00479	0,00528	0,0035	0,00425	0,00422	0,00447	0,00424	0,00424	0,00241	0,00417	0,00217	0,00326	1,4450733	0,007
P22352	GPX3	0,0001	8,8E-05	0,00014	8,5E-05	4,8E-05	0,00012	0,00011	8,1E-05	0,00013	2,4E-05	5,5E-05	1,6E-05	6,5E-05	7,1E-05	2,1821952	0,007
P05060	SCG1	3,4E-05	1,4E-05	7,6E-06	1,1E-05	3,1E-05	1,6E-06	1,6E-05	3,1E-05	1,3E-06	6E-05	5,3E-05	5,2E-05	4,9E-05	1,4E-05	0,3588034	0,012
P35527	K1C9	0,00118	0,00052	0,0003	0,00059	0,00125	0,00043	0,00042	0,00022	0,00065	0,00077	0,0014	0,00131	0,00122	0,00124	0,5208392	0,012
P02647	APOA1	0,00832	0,00953	0,01103	0,0113	0,00857	0,00966	0,01011	0,00757	0,00666	0,01273	0,02282	0,0176	0,0097	0,01109	0,6217287	0,012
P08294	SODE	0,00049	0,00041	0,00037	0,00035	0,0004	0,00034	0,00036	0,00047	0,00058	0,00067	0,00045	0,00076	0,00079	0,00052	0,6531038	0,012
P13645	K1C10	0,00118	0,00036	0,00029	0,00044	0,00088	0,00036	0,0004	0,0005	0,00063	0,00137	0,00088	0,00199	0,00091	0,00064	0,4823197	0,019
P01598	KV106	2E-05	6,7E-05	7,7E-05	7,1E-05	5,1E-05	4,5E-05	4,2E-05	6,1E-05	2,8E-05	4,6E-05	0,00011	9,1E-05	7,8E-05	0,00017	0,5192013	0,019
P01743	HV102	0,00016	0,00048	0,00062	0,00031	0,00032	0,00032	0,0003	0,00033	0,00011	0,00062	0,00085	0,00053	0,00059	0,00046	0,5387868	0,019
P00747	PLMN	0,00053	0,00087	0,0007	0,00054	0,0005	0,00049	0,0004	0,00056	0,00042	0,00068	0,00105	0,00066	0,00091	0,00076	0,6852583	0,019
P02533	K1C14	0,0001	5,1E-05	8,7E-05	5,5E-05	7,5E-05	4,7E-05	6,6E-05	5,8E-06	7,2E-05	5,3E-05	0,00017	0,00024	0,0003	0,00012	0,3541152	0,029
P00734	THRB	0,00041	0,00065	0,00048	0,00052	0,0006	0,00086	0,00089	0,00051	0,00024	0,00101	0,00266	0,00216	0,00054	0,00075	0,4030746	0,029
P35908	K22E	0,00046	0,00015	0,00015	0,00021	0,00042	0,00019	0,00021	0,00025	0,00029	0,00057	0,0004	0,0008	0,00044	0,00027	0,5192799	0,029
P36955	PEDF	0,00547	0,00583	0,00439	0,00413	0,00473	0,00466	0,00479	0,00524	0,00757	0,00795	0,00585	0,00645	0,00848	0,00508	0,7690538	0,029
P01008	ANT3	0,00343			0,00392	0,00351	0,0038	0,00386	0,00338	0,00392	0,00378	0,00619	0,00463	0,00493	0,00528	0,7433685	0,03
P07225	PROS	0,00024	0,0004	0,00039	0,00029	0,00039	0,00052	0,00057	0,00045	0,00022	0,0006	0,00091	0,00106	0,00056	0,00032	0,5565251	0,042
P02745	CIQA	2,5E-05	3,6E-05	3,9E-05	2,3E-05	3,1E-05	2,7E-05	4,8E-05	8E-05	4,4E-05	6,9E-05	7,7E-05	6,1E-05	8,9E-05	3,8E-05	0,5819552	0,042
P05067	A4	0,00068	0,00047	0,0003	0,00026	0,00051	0,00053	0,00054	0,00061	0,00059	0,00135	0,00105	0,00075	0,0007	0,0003	0,6015169	0,042
O14498	ISLR	3,3E-05	1,8E-05	2,2E-05	2,7E-05	2,1E-05	1,5E-05	1,8E-05	2,9E-05	3,1E-05	2,1E-05	1,6E-05	1,7E-05	4,3E-06	1,5E-05	1,5995314	0,042
Q92876	KLK6	0,00081	0,00063	0,00033	0,0009	0,00056	0,00057	0,00062	0,00058	0,00078	0,00034	0,00044	0,00024	0,00063	0,00033	1,6302136	0,042
P01034	CYTC	0,00544	0,00144	0,00222	0,00361	0,00232	0,00251	0,00258	0,00228	0,00366	0,00116	0,00205	0,00104	0,00287	0,00134	1,7086548	0,042

Tabela Suplementar S.5 - Proteínas alteradas na comparação entre o género masculino (DA Vs. DCL).

Número de identificação	Proteína	Doentes de Alzheimer							Doentes DCL						DA/DCL	p-value
		AM50	AM55	AM55*	AM71	AM77	MM56	MM58	MM63	MM64	MM70	MM72	MM72*			
P05452	TETN	1,2E-05	3,3E-06	2,6E-05	1,3E-05	1,6E-05	0,00024	0,00015	4,1E-05	0,00018	2,9E-05	5,3E-05	8,4E-05	0,12758	0,003	
P61769	B2MG	0,00018	0,00014	0,00018	0,00024	8,9E-05	0,0004	0,00025	0,00037	0,00068	0,00029	0,00028	0,00044	0,42737	0,003	
P01764	HV303	0,00059	0,00092	0,00053	0,00053	0,0008	0,00049	0,00034	0,00049	0,00038	0,00052	0,00031	0,00049	1,55792	0,003	
P00747	PLMN	0,00068	0,00105	0,00066	0,00091	0,00076	0,00047	0,00049	0,00054	0,00052		0,00047	0,0006	1,57512	0,004	
P04156	PRI0	5,7E-05	0,00006	5,7E-05	8E-05	2,7E-05	0,00016	0,00013	9,9E-05	0,00016	6,6E-05	0,00026	8,6E-05	0,41075	0,005	
O14498	ISLR	2,1E-05	1,6E-05	1,7E-05	4,3E-06	1,5E-05	2,5E-05	4,1E-05	2,1E-05	4E-05	3,4E-05	4,2E-05	3,7E-05	0,43065	0,005	
P08123	CO1A2	0,00011	0,00011	0,00011	0,00011		2,3E-05	4,5E-05	0,00011	6,1E-05	7,1E-05	6,3E-05	5,5E-05	1,82059	0,006	
P01034	CYTC	0,00116	0,00205	0,00104	0,00287	0,00134	0,00535	0,00377	0,00284	0,00664	0,00238	0,00759	0,0043	0,36071	0,01	
Q92876	KLK6	0,00034	0,00044	0,00024	0,00063	0,00033	0,00089	0,00113	0,00053	0,00159	0,00055	0,00112	0,00087	0,41154	0,01	
Q9GZM8	NDE1	0,00013	0,00011	0,00016	0,00013	0,00017	0,00022	0,00027	0,00021	0,00017	0,00022	0,00016	0,00024	0,6561	0,01	
P01743	HV102	0,00062	0,00085	0,00053	0,00059	0,00046	0,00025	0,00033	0,00028	7,6E-05	0,00054	0,00025	0,00033	2,07629	0,01	
P01860	IGHG3	0,00123	0,00051	0,00048	0,00056	0,00019	0,00011	4E-05	0,0003	9,1E-05	0,00021	7,1E-05	0,00014	4,30357	0,01	
P02766	TTHY	0,0098	0,00817	0,0063	0,01676	0,01465	0,04155	0,02513	0,01464	0,04163	0,01652	0,03004	0,02653	0,39761	0,018	
P05090	APOD	0,00177	0,00243	0,00184	0,00437	0,00133	0,00368	0,00458	0,00271	0,00525	0,00259	0,00442	0,00555	0,57124	0,018	
O95502	NPTXR	0,00011	9,1E-05	3,5E-05	0,00012	3,8E-05	0,00021	0,00021	5,6E-05	0,00044	0,00012	0,00038	0,00017	0,35088	0,03	
P02750	A2GL	0,00018	0,00012	0,00019	0,00029	0,0004	0,0004	0,00033	0,00034	0,00053	0,00063	0,00033	0,00039	0,5657	0,03	
P23142	FBLN1	0,00168	0,00157	0,00136	0,00202	0,00099	0,00076	0,00087	0,00093	0,0011	0,00107	0,00125	0,00114	1,49379	0,03	
P02745	CIQA	6,9E-05	7,7E-05	6,1E-05	8,9E-05	3,8E-05	2,1E-05	2,5E-05	2,2E-05	3,9E-05	4,5E-05	5,4E-05	4E-05	1,905	0,03	
P02452	CO1A1	0,00046	0,00056	0,0007	0,00048	0,00017	0,00015	0,00015	0,00045	0,00019	0,00029	0,00014	0,00032	1,97897	0,03	
Q14393	GAS6	5E-05	5E-05	5,9E-05	2,3E-05	2,2E-05	1,5E-05	5,5E-06	4,6E-05	1,3E-05	7E-06	1,5E-05	3,5E-05	2,07877	0,03	
Q8WWD2	SCG3	0,00026	0,00014	0,0001	0,00022	3E-05	0,00027	0,00027	0,00021	0,00043	0,00012	0,00051	0,0004	0,47795	0,048	
P22352	GPX3	2,4E-05	5,5E-05	1,6E-05	6,5E-05	7,1E-05	0,0002	9,5E-05	2,4E-05	0,0001	9,9E-05	8,4E-05	7E-05	0,47971	0,048	
P20774	MIME	0,00046	0,00039	0,00026	0,00072	0,00033	0,00109	0,00088	0,00044	0,00116	0,00036	0,00114	0,001	0,49534	0,048	
Q96S96	PEBP4	7,6E-05	0,00012	0,00011	0,00011	5,1E-05	0,00012	0,00011	0,00017	0,00023	0,00012	0,00017	0,00015	0,62954	0,048	
P13473	LAMP2	0,00025	0,00025	0,00014	0,00022	0,00015	0,00026	0,00027	0,00016	0,00033	0,00023	0,00034	0,00035	0,72372	0,048	
P02774	VTDB	0,00424	0,00241	0,00417	0,00217	0,00326	0,00522	0,00443	0,00301	0,00521	0,00458	0,00363	0,0053	0,72534	0,048	

Tabela Suplementar S.6 - Proteínas alteradas na comparação entre o género feminino (DA Vs. DCL).

Número de identificação	Proteína	Doentes de Alzheimer									Doentes DCL								AF/MF	p-value	
		AF63	AF66	AF67	AF71	AF72	AF722	AF73	AF77	AF79	MF54	MF57	MF58	MF63	MF64	MF65	MF67	MF76			MF83
Q14982	OPCM	0,000111	0,0000654	0,0000338	0,0000599	0,0000723	0,0000831	0,0000913	0,000103	0,000081	0,0000987	0,000122	0,000166	0,000238	0,000126	0,000221	0,000205	0,000243	0,000138	0,44989	0
P48058	GRIA4	0,0000248	0,0000305	0,0000205	0,00000735	0,0000341	0,0000327	0,0000345	0,000025	0,0000536	0,0000468	0,0000384	0,0000706	0,0000484	0,000055	0,0000844	0,000083	0,0000688	0,0000574	0,47585	0
P05067	A4	0,000684	0,000468	0,000302	0,000259	0,000514	0,000532	0,000536	0,000608	0,000586	0,000904	0,000708	0,001707	0,001034	0,000628	0,001167	0,001258	0,001264	0,000551	0,48682	0
Q7Z3B1	NEGR1	0,0000925	0,0000615	0,0000628	0,000098	0,000106	0,0000978	0,0000932	0,000142	0,000131	0,00011	0,000181	0,000205	0,000175	0,000286	0,00023	0,000296	0,000167	0,50129	0	
P04216	THY1	0,000671	0,000353	0,000134	0,000305	0,000434	0,000476	0,00049	0,000434	0,000429	0,000531	0,000479	0,000823	0,001086	0,000729	0,001401	0,000759	0,001075	0,000525	0,50297	0
P78324	SHPS1	0,000387	0,000387	0,000169	0,000221	0,000404	0,000329	0,000339	0,000461	0,000369	0,000477	0,000548	0,000685	0,000657	0,00071	0,000957	0,000475	0,001049	0,000482	0,50762	0
Q9P121	NTRI	0,000145	0,0000979	0,0000654	0,0000824	0,000104	0,0000897	0,0000887	0,000128	0,000202	0,000149	0,00017	0,00023	0,000291	0,000177	0,000218	0,000249	0,000224	0,00015	0,53988	0
Q14515	SPRL1	0,000771	0,000543	0,000471	0,000517	0,000669	0,000551	0,0006	0,000721	0,000915	0,001185	0,001014	0,001433	0,001662	0,000934	0,001067	0,001139	0,000952	0,000685	0,57174	0
P13645	K1C10	0,001176	0,000362	0,00029	0,000437	0,000882	0,000359	0,000395	0,000495	0,000629	0,001228	0,001277	0,003175	0,000589	0,002105	0,001301	0,002391	0,000826	0,001214	0,35623	0,001
P35908	K22E	0,000458	0,000152	0,000147	0,000207	0,00042	0,000186	0,000205	0,000294	0,000525	0,000604	0,001366	0,000286	0,000841	0,000611	0,000901	0,000368	0,000531	0,38439	0,001	
P04264	KZC1	0,003029	0,001531	0,000963	0,001694	0,00331	0,00135	0,001353	0,000919	0,001944	0,003386	0,003663	0,010138	0,002058	0,005694	0,003538	0,00606	0,001912	0,00464	0,39166	0,001
Q8WYXD2	SCG3	0,000295	0,0000996	0,0000546	0,0000909	0,000157	0,000113	0,00012	0,00013	0,000251	0,000215	0,000243	0,000433	0,000043	0,000264	0,000371	0,000486	0,000355	0,000277	0,42651	0,001
Q9ULB1	NRX1A	0,0000691	0,0000521	0,0000345	0,0000231	0,0000284	0,0000726	0,0000734	0,0000741	0,000091	0,0000778	0,0000849	0,000176	0,00018	0,0000868	0,000164	0,000141	0,00014	0,0000737	0,46104	0,001
Q08629	TICN1	0,0000284	0,0000185	0,0000106	0,000018	0,0000229	0,000024	0,000023	0,0000185	0,0000493	0,0000443	0,0000372	0,000056	0,0000521	0,0000382	0,0000419	0,0000615	0,000053	0,0000436	0,49836	0,001
Q9Y4CO	NRX3A	0,000129	0,0000893	0,0000362	0,0000499	0,0000598	0,000105	0,00011	0,0000993	0,00013	0,000134	0,000121	0,000234	0,000222	0,000128	0,000209	0,000221	0,000224	0,000122	0,50062	0,001
P54289	CA2D1	0,000146	0,0000709	0,0000428	0,00005	0,000109	0,0000822	0,0000792	0,0000842	0,0000932	0,0000941	0,000105	0,000244	0,000216	0,000145	0,000205	0,000177	0,000183	0,000117	0,50972	0,001
P04156	PRIO	0,000109	0,000035	0,0000302	0,000056	0,0000604	0,0000598	0,0000713	0,0000578	0,0000574	0,0000703	0,0000718	0,0000969	0,000188	0,0000972	0,000125	0,000156	0,00012	0,000125	0,51124	0,001
P16870	CBPE	0,000329	0,000266	0,000206	0,000174	0,000307	0,00024	0,000259	0,000328		0,000404	0,000464	0,000621	0,000504	0,000467	0,000476	0,000665	0,000592	0,00027	0,53162	0,001
O15394	NCAM2	0,000187	0,000219	0,0000986	0,0000914	0,000173	0,000194	0,0002	0,000216	0,000326	0,000294	0,000256	0,00038	0,000486	0,000422	0,00037	0,000428	0,000315	0,000211	0,53922	0,001
Q9NQ79	CRAC1	0,00076	0,000486	0,000374	0,000309	0,00051	0,000537	0,000578	0,000596	0,000653	0,000632	0,000773	0,001125	0,001433	0,000765	0,000891	0,001061	0,001069	0,000551	0,57867	0,001
P23471	PTPRZ	0,00021	0,000188	0,000106	0,0000886	0,000154	0,000189	0,000181	0,000218	0,000298	0,000241	0,000291	0,000313	0,000383	0,000312	0,000323	0,000388	0,000372	0,000196	0,57914	0,001
P12109	CO6A1	0,000199	0,00019	0,000122	0,0000729	0,000194	0,000162	0,000169	0,000191	0,000304	0,000246	0,000225	0,000323	0,000291	0,0003	0,000314	0,000367	0,000302	0,000199	0,62481	0,001
P24592	IBP6	0,000178	0,000194	0,00015	0,000148	0,000148	0,000127	0,000147	0,000141	0,000187	0,000261	0,0002	0,000176	0,00017	0,000318	0,000285	0,000258	0,000244	0,000253	0,65589	0,001
Q9GZM8	NDEL1	0,000148	0,000168	0,000123	0,000155	0,000135	0,000154	0,000155	0,000114	0,000166	0,000219	0,000174	0,000192	0,000173	0,000196		0,00017	0,000155	0,000233	0,77484	0,001
Q13449	LSAMP	0,000252	0,000152	0,0000806	0,000112	0,000222	0,000135	0,000178	0,000132	0,000277	0,000148	0,000336	0,000305	0,000478	0,000339	0,000415	0,000285	0,000437	0,000244	0,51577	0,002
P13591	NCAM1	0,001079	0,000805	0,000478	0,000472	0,000922	0,000999	0,001101	0,001303	0,001348	0,001174	0,001432	0,001959	0,002575	0,001467	0,001896	0,001846	0,001845	0,000967	0,56111	0,002
Q9P252	NRX2A	0,000176	0,000126	0,0000503	0,0000585	0,000105	0,000114	0,000103	0,000109	0,000181	0,000127	0,00014	0,000214	0,000179	0,000202	0,000236	0,000247	0,00025	0,000136	0,59087	0,002
P01019	ANGT	0,006268	0,005484	0,004218	0,004319	0,005009	0,004307	0,005632	0,006097		0,004723	0,006577	0,009383	0,007951	0,008505	0,007951	0,012847	0,01313	0,006133	0,60234	0,002
P08294	SODE	0,000487	0,000407	0,000366	0,000352	0,000396	0,000337	0,000361	0,000468	0,000582	0,000637	0,001062	0,000877	0,000748	0,000467	0,000483	0,000731	0,000575	0,000556	0,61213	0,002
P02533	K1C14	0,0001	0,0000513	0,0000871	0,000055	0,000075	0,0000467	0,0000662	0,0000576	0,0000715	0,0000994	0,000147	0,000306	0,0000767	0,000283	0,000118	0,00015	0,0000635	0,000171	0,39485	0,003
Q99574	NEUS	0,000132	0,000107	0,0000528	0,0000934	0,000103	0,0000945	0,0000983	0,0000826	0,000167	0,0000993	0,000118	0,000187	0,000218	0,000139	0,000208	0,000251	0,000245	0,000153	0,57505	0,003
P02649	APOE	0,014428	0,009712	0,004908	0,005641	0,015015	0,011258	0,011747	0,017421	0,017713	0,017382	0,020122	0,026028	0,019704	0,024406	0,017101	0,022689	0,023185	0,012906	0,58763	0,003
Q96KN2	CNDP1	0,002159	0,001963	0,00125	0,00162	0,002472	0,001877	0,001847	0,001961	0,002789	0,001887	0,002915	0,002963	0,003646	0,002593	0,003736	0,000454	0,003669	0,002241	0,63619	0,003
Q02246	CNTN2	0,00041	0,000384	0,000285	0,000167	0,000496	0,000333	0,000358	0,000596	0,000589	0,000597	0,000604	0,000706	0,000625	0,000651	0,000546	0,000818	0,00077	0,000347	0,63877	0,003
P43652	AFAM	0,000797	0,00125	0,001175	0,000744	0,000809	0,001336	0,001356	0,000769	0,000772	0,000743	0,000519	0,000565	0,000509	0,000511	0,000876	0,000662	0,00073	0,000782	1,52756	0,003
Q7Z7M0	MEGF8	0,000129	0,0000918	0,0000377	0,0000383	0,000115	0,000112	0,000123	0,0000647	0,00013	0,000134	0,0000915	0,000292	0,000169	0,000215	0,000259	0,000229	0,00024	0,000115	0,48237	0,004
Q6NVW40	RGM8	0,0000242	0,0000204	0,0000101	0,0000146	0,0000156	0,0000248	0,0000276	0,0000164	0,0000313	0,0000241	0,0000165	0,000036	0,0000439	0,0000365	0,000046	0,000056	0,0000553	0,0000349	0,52978	0,004
Q96GVW7	PGCB	0,000934	0,000895	0,000461	0,000493	0,000767	0,000791	0,000811	0,000911	0,001149	0,001197	0,001113	0,001885	0,001248	0,00108	0,001804	0,001788	0,001839	0,000763	0,56711	0,004
O43505	B4GA1	0,00169	0,001152	0,000677	0,000821	0,00102	0,001121	0,001171	0,001246	0,001769	0,001201	0,001265	0,002013	0,002345	0,001355	0,002013	0,002732	0,002661	0,001355	0,62969	0,004
P41222	PTGDS	0,032496	0,023813	0,012807	0,018509	0,026778	0,027015	0,027642	0,023821	0,032623	0,024009	0,031124	0,028399	0,04847	0,038556	0,042721	0,049525	0,050799	0,03525	0,64642	0,004
O14498	ISLR	0,0000332	0,0000183	0,0000221	0,0000267	0,0000207	0,0000152	0,0000175	0,0000288	0,0000305	0,0000276	0,0000304	0,0000407	0,0000324	0,0000295	0,000035	0,0000329	0,0000447	0,0000364	0,68798	0,004
O60241	AGRB2	0,0000356	0,00000926	0,00000283	0,0000218	0,00000579	0,00000946	0,0000127	0,0000016	0,0000141	0,000014	0,0000142	0,0000161	0,0000441	0,000015	0,0000509	0,0000374	0,0000399	0,0000246	0,44161	0,006
P40925	MDHC	0,0000231	0,000011	0,0000023	0,00000636	0,00000555	0,00000772	0,0000102	0,0000189	0,0000177	0,0000134	0,0000163	0,0000329	0,0000439	0,0000217	0,0000233	0,0000286				

Tabela Suplementar S.6 – Continuação.

Número de identificação	Proteína	Doentes de Alzheimer									Doentes DCL								AF/MF	p-value	
		AF63	AF66	AF67	AF71	AF72	AF722	AF73	AF77	AF79	MF54	MF57	MF58	MF63	MF64	MF65	MF67	MF76			MF83
P36955	PEDF	0,005468	0,005831	0,004392	0,004128	0,004734	0,004662	0,004787	0,005239	0,007569	0,005629	0,007478	0,00721	0,008552	0,007374	0,008334	0,007577	0,007125	0,00485	0,72993	0,006
P08185	CBG	0,000267	0,000376	0,0004	0,000272	0,000218	0,000259	0,000274	0,000224	0,000193	0,000184	0,000168	0,000158	0,000215	0,00025	0,000167	0,000245	0,000165	0,000255	1,3741	0,006
P05452	TETN		0,0000192	0,0000184		0,00000201	0,0000266	0,0000285	0,0000252	0,0000484	0,0000536	0,0000273	0,0000257	0,000142	0,000027	0,0000715	0,0000679	0,000103	0,0000816	0,3609	0,008
P19021	AMD	0,0000674	0,0000308	0,0000227	0,0000393	0,0000409	0,000043	0,0000429	0,0000269	0,0000594	0,0000298	0,0000491	0,0000688	0,000127	0,0000566	0,0000743	0,000117	0,0000809	0,0000859	0,54149	0,008
O94985	CSTNI	0,001822	0,001087	0,000659	0,000671	0,000984	0,00101	0,00109	0,001281	0,001951	0,001098	0,001708	0,001992	0,002602	0,001153	0,001902	0,002953	0,002497	0,001522	0,60567	0,008
P63261	ACTG	0,000182	0,000106	0,00025	0,000123	0,000154	0,00012	0,000123	0,00018	0,000202	0,000126	0,000164	0,000297	0,000262	0,000275	0,00046	0,000284	0,000264	0,000197	0,61829	0,008
P10909	CLUS	0,010514	0,009595	0,005253	0,006405	0,011208	0,008874	0,009072	0,010638	0,011984	0,01327	0,009558	0,016725	0,010472	0,015547	0,014251	0,018869	0,017452	0,010656	0,65886	0,008
Q9Y646	CBPQ	0,00013	0,000141	0,0000897	0,0000743	0,000135	0,0000876	0,0000826	0,000114	0,000195	0,000187	0,000159	0,000204	0,000124	0,000144	0,000206	0,000234	0,000208	0,000122	0,66071	0,008
P78509	RELN	0,00025	0,000344	0,000156	0,0000707	0,000232	0,000299	0,000303	0,000268	0,000536	0,000374	0,000321	0,000588	0,000411	0,000301	0,00043	0,000567	0,000382	0,000334	0,66308	0,008
P02747	C1QC	0,0000859	0,000147	0,000162	0,0000962	0,000177	0,000145	0,000154	0,000219	0,000236	0,000236	0,000214	0,000277	0,000259	0,00027	0,00022	0,000181	0,000226	0,000149	0,69985	0,008
P08123	COIA2	0,00000959	0,0000536	0,0000524	0,0000292	0,0000521	0,0000371	0,00002	0,0000497	0,0000532	0,0000867	0,0000664	0,000124	0,0000885	0,000095	0,0000748	0,0000685	0,000044	0,0000282	0,52755	0,011
P61769	BZMG		0,000121	0,000156	0,000349	0,000179	0,000113	0,000154	0,00014	0,000194	0,000223	0,000228	0,000293	0,000546	0,000175	0,000222	0,000442	0,000396	0,000163	0,58845	0,011
Q13740	CDI66	0,0000927	0,0000696	0,0000397	0,0000573	0,0000771	0,0000732	0,0000706	0,0000914	0,000105	0,0000718	0,0000877	0,000103	0,000141	0,000103	0,000143	0,000187	0,000166	0,0000919	0,61824	0,011
Q9NT99	LRC4B	0,0000821	0,0000606	0,0000299	0,0000309	0,0000504	0,0000681	0,0000703	0,0000599	0,0000987	0,0000741	0,0000606	0,0000902	0,000101	0,0000862	0,000119	0,000133	0,0000679	0,63688	0,011	
P08571	CD14	0,000565	0,000558	0,000443	0,000443	0,000455	0,00064	0,00064	0,000734	0,000782	0,00079	0,000702	0,001008	0,000682	0,000832	0,000808	0,00069	0,00081	0,000553	0,77091	0,011
P02790	HEMO	0,008901	0,014582	0,016691	0,011302	0,006091	0,013099	0,013493	0,011254	0,01194	0,007803	0,007035	0,006264	0,006083	0,007219	0,00825	0,009247	0,008862	0,011887	1,47767	0,011
P02749	APOH	0,000405	0,000819	0,0007	0,000858	0,000348	0,000818	0,000905	0,000769	0,000664	0,000256	0,000463	0,00024	0,000405	0,00045	0,000336	0,000362	0,000564	0,0007	1,66472	0,011
P35527	K1C9	0,001178	0,000524	0,000295	0,000593	0,001251	0,000427	0,000424	0,000222	0,000652	0,000981	0,001141	0,0003285	0,000761	0,001619	0,000592	0,000492	0,001837	0,43198	0,014	
P54764	EPHA4	0,0000355	0,0000298	0,0000169	0,0000244	0,0000278	0,0000367	0,000028	0,0000402	0,0000399	0,000028	0,0000319	0,0000548	0,0000827	0,0000354	0,0000663	0,0000723	0,0000768	0,0000499	0,56053	0,014
O94856	NFASC	0,000145	0,0000966	0,0000456	0,0000399	0,000113	0,0000845	0,000106	0,000122	0,00014	0,000105	0,000133	0,000193	0,000183	0,000135	0,000221	0,000214	0,000224	0,00011	0,58801	0,014
Q9UBP4	DKK3	0,001815	0,000768	0,000716	0,000968	0,001099	0,001018	0,001156	0,001185	0,001704	0,001064	0,001138	0,001477	0,000286	0,001241	0,001743	0,002524	0,002601	0,001755	0,64873	0,014
P13473	LAMP2	0,000252	0,000205	0,000117	0,000183	0,000254	0,000246	0,000254	0,000247	0,000294	0,000239	0,000221	0,000276	0,000395	0,000309	0,000484	0,00041	0,000457	0,000366	0,64998	0,014
P02760	AMBP	0,000193	0,000283	0,000296	0,000369	0,000135	0,000325	0,000358	0,000209	0,000212	0,000116	0,000144	0,000163	0,000165	0,00021	0,000175	0,000183	0,000175	0,000246	1,50919	0,014
Q6ZM13	GLDN	0,00000579	0,0000276	0,0000064	0,0000102	0,0000233	0,0000172	0,0000235	0,0000213	0,0000368	0,0000236	0,0000215	0,0000506	0,0000237	0,0000455	0,0000562	0,0000361	0,0000402	0,0000172	0,54701	0,019
P51693	APLP1	0,001242	0,00065	0,000407	0,000558	0,000615	0,000723	0,000711	0,00077	0,000822	0,000609	0,000715	0,000986	0,0001368	0,000944	0,001391	0,001686	0,001558	0,001012	0,63278	0,019
Q92859	NEO1	0,0000292	0,000171	0,000113	0,000106	0,000104	0,000171	0,000168	0,000187	0,000273	0,000151	0,000197	0,000272	0,000383	0,000249	0,00033	0,000401	0,000343	0,000205	0,64046	0,019
P02768	ALBU	0,562221	0,596287	0,537583	0,600518	0,618695	0,567157	0,573434	0,596303	0,544058	0,608777	0,567605	0,526391	0,552619	0,530768	0,494321	0,451099	0,488943	0,512665	1,09783	0,019
P00450	CERU	0,002098	0,003427	0,004737	0,002447	0,002136	0,004053	0,00421	0,002878	0,002672	0,002158	0,002327	0,00205	0,002244	0,001635	0,001919	0,002229	0,002116	0,002926	1,46184	0,019
P02652	APOA2		0,0000367	0,0000369		0,0000507	0,0000511	0,0000514	0,0000421	0,0000481	0,000107	0,0000806	0,000109	0,0000883	0,0000975	0,0000485	0,000112	0,000074	0,0000344	0,54249	0,023
Q92823	NRCAM	0,00174	0,001014	0,000577	0,00075	0,001176	0,001187	0,001215	0,00131	0,001457	0,000937	0,0012	0,001705	0,002597	0,00149	0,002475	0,002329	0,00249	0,001422	0,62637	0,024
P07195	LDHB	0,000133	0,0000957	0,0000534	0,0000393	0,0000891	0,000111	0,000139	0,000245	0,000219	0,00015	0,000153	0,000233	0,000303	0,000138	0,000177	0,000234	0,000263	0,000128	0,6321	0,024
P07998	RNAS1	0,0000591	0,0000842	0,0000731	0,00013	0,000144	0,000161	0,000166	0,000175	0,000151	0,000147	0,000245	0,000236	0,000283	0,00021	0,000242	0,000102	0,000189	0,000139	0,63777	0,024
P39060	COIA1	0,0000318	0,0000383	0,0000288	0,0000248	0,0000382	0,0000256	0,0000314	0,0000395	0,000043	0,0000358	0,00000342	0,0000531	0,0000606	0,0000523	0,000056	0,0000576	0,0000415	0,0000408	0,7514	0,024
P01703	LVI05	0,000145	0,000156	0,000275	0,000305	0,000232	0,000165	0,000148	0,000118	0,0000813	0,0000758	0,000138	0,0000798	0,0000993	0,000114	0,000164	0,00011	0,000146		1,55865	0,027
P05060	SCG1	0,0000336	0,000014	0,00000764	0,0000108	0,0000031	0,0000015	0,00000161	0,0000309	0,00000131	0,0000426	0,0000303	0,0000669	0,0000587	0,0000288	0,0000225	0,0000261	0,000029	0,0000328	0,43509	0,031
Q14393	GAS6	0,00000218	0,0000202	0,00000994	0,00000354	0,00000262	0,0000198	0,0000187	0,0000247	0,00000255	0,0000221	0,000024	0,0000602	0,0000305	0,00000333	0,00000226	0,00000259	0,00000259	0,00000259	0,44884	0,031
Q99435	NELL2	0,000368	0,000251	0,000157	0,000166	0,000293	0,000386	0,000377	0,000449	0,000436	0,000275	0,000337	0,000606	0,000776	0,00054	0,000835	0,000775	0,000879	0,00035	0,53657	0,031
O14594	NCAN	0,000364	0,000218	0,000113	0,000145	0,000189	0,000188	0,000183	0,000261	0,000224	0,000175	0,000205	0,000273	0,000348	0,000261	0,000536	0,000483	0,000506	0,000228	0,62521	0,031
P07477	TRY1	0,0004674	0,001934	0,001939	0,001586	0,003321	0,001787	0,001838	0,002747	0,002715	0,003743	0,004695	0,005539	0,00267	0,00474	0,004548	0,005313	0,002926	0,001671	0,62885	0,031
P20774	MIME	0,0000891	0,000552	0,000337	0,000597	0,000491	0,000308	0,000357	0,000479	0,00091	0,000749	0,000775	0,001095	0,000645	0,000541	0,000685	0,000831	0,000988	0,000881	0,68456	0,031
P09871	CIS	0,000827	0,000715	0,000579	0,000588	0,000556	0,000591	0,000609	0,000782	0,000942	0,000654	0,000722	0,000941	0,001091	0,000741	0,000905	0,001116	0,001105	0,000671	0,77888	0,031
Q08380	LG3BP	0,001195	0,000755	0,000792	0,000657	0,000857	0,000813	0,000808	0,001107	0,001209	0,000979	0,000963	0,001176	0,001226	0,000939	0,001169	0,001378	0,001308	0,00086	0,81946	0,031
P07954	FUMH	0,000241	0,000267	0,000217	0,000247	0,000268	0,000302	0,000276	0,000228	0,000253	0,00035	0,000267	0,000291	0,000237	0,00028	0,000304	0,000278	0,000297	0,000271	0,89282	0,031
P0																					