

**ANÁLISE DE DANOS AO DNA E EXPRESSÃO DE
GENES SUPRESSORES DE TUMOR EM TECIDO
POST MORTEM DE PACIENTES COM DOENÇA
DE ALZHEIMER**

ANA CECÍLIA FEIO DOS SANTOS

**Tese apresentada à Fundação Antônio Prudente
para a obtenção do título de Doutor em Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

Orientadora: Prof. Dra. Helena Brentani

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Lima Reis

São Paulo

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Santos, Ana Cecília Feio dos

Análise de danos ao DNA e expressão de genes supressores de tumor em tecido post mortem de pacientes com doença de Alzheimer / Ana Cecília Feio dos Santos – São Paulo, 2012.

140p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientadora: Helena Brentani

Descritores: 1. DOENÇA DE ALZHEIMER. 2. GENES SUPRESSORES DE TUMOR. 3. DANOS AO DNA.

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

Agradeço às agências financiadoras e instituições que tornaram possível esse projeto.

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (projeto 2011/01652-6);
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES;
- Centro Internacional de Pesquisa e Ensino do Hospital A. C. Camargo
- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP/USP);
- Agradeço especialmente à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela concessão da bolsa de estudos, processo nº 2009/02030-9.;

DEDICATÓRIA

Aos amores da minha vida...

AGRADECIMENTOS

À Dra. Helena Brentani, minha orientadora, pela confiança, incentivo e por todos os ensinamentos valiosos. Você é uma inspiração... Ainda, a Helena, minha querida amiga, pelas lições pra vida, amizade inestimável... ter te conhecido, feito parte do seu grupo e da sua vida, me faz sentir a pessoa mais sortuda do mundo!!! Muito obrigada!!!

Aos meus queridos amigos - não importa se de hoje, mas tenho certeza que pro resto de nossas vidas - que de longe ou bem de pertinho acompanharam essa trajetória me dando força, incentivo... vocês são demais!!! Os de lá... Emília (amiga de sempre) e Igã, Bené Jr. (pretinho básico), Neila (namo-irmã), Bruno (sempre juntos), Larissa e Marcus (tia e tio), Margarida (amiga-irmã) e Aldo, Paloma... E lógico os daqui, nem sempre de todos os dias, mas com certeza de todas as sextas... Ana, Renato, Barbara, Tati, Marcelo, Edu, Fabi, Laura, Cássio, Lud, Dudu, Cairo, Gê... Amo todos vocês...

Ao Renatinho e a Andressa Pereira pela acolhida, pela amizade, por sempre fazer parte dessa jornada, mesmo de longe.

Ao Aderbal, companheiro de todas as horas, fiel escudeiro... no trabalho, cafés, congressos, cervejas... por seu companheirismo e amizade, muito obrigada!!!

À informática médica e bioinformática de antes – Diogo Patrão, Luiz Paulo Camargo, Eduardo Abrantes, César Torres, Fábio Mathias, Marcelo Sagayama, Mário Dourado, Renato Puga, Bárbara Mello. Era sempre muito bom estar com todos vocês! Muita saudade!!!

À informática médica e bioinformática “new generation” - Michel Oleynik, Ricardo Sekeff, Felipe Massicano, Leandro Lima, Aline Damascena e Guilherme Oliveira... e os que ainda estão por aqui, obrigada por tudo, pela paciência, pelo espaço, pelos cafés, por participarem desses últimos meses difíceis e ainda me suportarem... Muito obrigada mesmo!!!

À Aline Damascena pelas contribuições, incrível paciência e por seu sorriso de todas as manhãs... Obrigada por tudo!!!

Ao Dr. Carlos Alberto de Bragança Pereira, prof. Carlinhos, um grande mestre! Muito obrigada pela inestimável contribuição, incentivo e paciência.

À turma do café: Roberto Ferreira (cafetino oficial - piada interna), Deborah MUNDIN (uma das pessoas mais idiotas que eu já conheci! – piada interna), Rogério Nazário, Sandra Viola, Luciane Kagohara, Júlia Mello (cafetina substituta), Felipe Fidalgo, Fernanda Fortes,

Iara Buzzo, Ana Hatagima, Juliano Jampietro... NÃO TENHO PALAVRAS... mas, talvez, muito risos e histórias! Obrigada!

Aos amigos de pós-graduação Andrezza, Flávia e Luiz Guidoni, caminhar com vocês foi inenarrável! Vocês são muito especiais e certamente fazem parte dessa tese.

Aos amigos Roberto e Deborah pelas discussões, brincadeiras, conforto e incentivo durante os cafés, e mais ainda por deixarem os dias mais alegres e mais leves!!!

A todos do Banco de Cérebros, BEHGEEC - FMUSP, em nome da Dr. Léa Grinberg e Dr. José Marcelo Farfel, pelas amostras, e pela valiosa contribuição neste trabalho. Sem vocês, esse trabalho não seria possível.

À Dra. Dirce Carraro, pelos conhecimentos e experiências compartilhados. A contribuição neste trabalho é instimável. Obrigada!!!

À Dra. Elisa Napolitano pelos inestimáveis orientações, ensinamentos e sua amizade.

A todos do LGBM, Dr. Alex Fiorini, Danielle Bragio, Carol Abuazar, Roberto Ferreira, Giovana Tardin, Márcia Figueredo, Mabel Gigliola, Elisa Napolitano, Tatiana Ricca, Cristiane Pinho, Bruna Barros, Bianca Lisboa, Mayra Toledo, Gustavo Molina, Ana Paula, Louise Mota e Camila pelos anos de convivência, pela troca de experiências, e pelo companheirismo.

À Eloisa Olivieri e Vera Prescinoti, pela inestimável ajuda com o início (meio e fim) da tese, em meios de DNAs e RNAs... pela paciência, por muitos risos, músicas, danças e mais do que isso, pela inestimável amizade!

Ao Dr. Roger Chammas e Dra. Camila Machado Longo pela colaboração e pela contribuição nos experimentos proteicos.

À Dra. Vilma Martins pelas preciosas contribuições.

Ao grupo da patologia em nome do Dr. Fernando Soares pela valiosa colaboração.

Ao Dr. Rafael Malagoli pela inestimável contribuição e disponibilidade.

Ao Dr. Antônio Hugo campos por ter aceito fazer parte desse trabalho e pela disponibilidade, até mesmo nos momentos mais difíceis... muito obrigada! Ao Hugo pelas risadas, músicas e acima de tudo compreensão... Obrigadíssima!

Ao Ivan Neves, Fátima e Simone pela super orientação com os anticorpos... Muito obrigada!!!

À pós-graduação do hospital A.C. Camargo, em especial as queridíssimas Vanusa, Luciana e Ana. Obrigada por tudo!

À Biblioteca, em especial à Suely, pela super paciência com a formatação desta tese. Mais ainda, pela disponibilidade e por sempre receber as pessoas com um bom humor e um sorriso. Muito obrigada!

No final dessa jornada tenho certeza que sou muito sortuda por ter conhecido e convivido com pessoas brilhantes. Em especial com o Dr. Ricardo Brentani (*in memoriam*), grande mestre. Obrigada por ter sido um grande cientista, um grande mestre, grande entusiasta da ciência de excelência. Sempre será a inspiração para os que te conheceram.

Agradeço e dedico especialmente aos amores eternos da minha vida, que são a minha força, meu incentivo, meu exemplo, meu alicerce, meus amigos... pai (Stélio) e mãe (Selma)... sou eternamente grata por cada abraço, cada carinho, cada bronca, principalmente pelos limites, educação que me tornaram o que sou hoje. Meu eterno obrigada... amo muito vocês sempre e pra sempre...

A minha irmã Emília, que é a melhor amiga de todo o mundo, exemplo de vida, de mulher, de força, de perseverança... Te amo nem sempre, mas pra sempre.

E lógico, ao amor da minha vida, Paulo. Quero passar minha vida inteira ao teu lado, não importa quais os desafios que teremos que enfrentar. Sei que ainda teremos muitos momentos de felicidade, alegria, risos, brincadeiras e conquistas. Não existe mais o meu sucesso, existe o NOSSO sucesso. Minha vida é tua! Obrigada!!!

RESUMO

Santos ACF. **Análise de danos de DNA e expressão de genes supressores de tumor em tecido *post mortem* de pacientes com doença de Alzheimer.** São Paulo; 2012. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

O estresse oxidativo está presente na doença de Alzheimer (DA) em todas as fases, inclusive na doença de Alzheimer assintomática (asDA), e é uma característica inicial da DA. Recentes pesquisas demonstram que o dano oxidativo está intimamente relacionado aos estágios iniciais do processo de declínio cognitivo, na transição para a DA. Na tentativa de reparo dessas danos, a maquinaria mitótica é aberrantemente disparada o que pode ser crucial para o processo neurodegenerativo da DA. Entendendo que estresse oxidativo, reparo de DNA e reentrada no ciclo celular são mecanismos importantes na DA, e que a relação entre os mesmos pode estabelecer parâmetros da progressão da doença, avaliamos danos oxidativos por marcadores de DNA (8OHdG e H2AX) e peroxidação lipídica (Malondialdeído); e supressores de tumor em três áreas cerebrais acometidas em diferentes fases da doença, para estudar possíveis relações entre estes fatores e alterações anatomopatológicas, assim como a presença de sintomas clínicos. Demonstramos dano oxidativo aumentado em neurônios dos corticais de pacientes DA em relação a indivíduos asDA e com envelhecimento normal; entretanto, nenhuma evidência de sinalização ou reparo de DNA. Ainda nos córtices, indivíduos asDA têm níveis próximos de danos de biomoléculas de indivíduos com envelhecimento normal. Importaneamente, não achamos nenhuma alteração dos marcadores de dano e produtos gênicos relacionados a reparo de DNA no hipocampo, que é local de início da neuropatologia de Alzheimer. É possível que, no hipocampo, os danos de DNA sejam compensados por outros mecanismos não relacionados com reparo de DNA. Contudo, no córtice é provável que os níveis de danos oxidativos sejam preponderantes para o disparo da demência. Apoio financeiro: FAPESP, processo nº 2009/02030-9.

SUMMARY

Santos ACF. **[DNA damage and expression of tumor suppressor genes analysis in post-mortem tissues of Alzheimer's Disease]**. São Paulo; 2012. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Oxidative stress existing in Alzheimer's disease (AD) in all stages including asymptomatic Alzheimer disease (asDA), and it is an initial characteristic of AD. Recent studies show that oxidative damage is closely related to the initial stages of the cognitive process decline in the transition to AD. In an attempt to repair the damage, mitotic machinery is aberrantly triggered which can be crucial for the AD neurodegenerative process. Considering that oxidative stress, DNA repair and cell cycle reentry are important mechanisms in AD and the relationship between them may establish parameters of disease progression, we assessed oxidative damage through DNA markers (8OHdG and H2AX) and lipid peroxidation marker (Malondialdehyde), and tumor suppressors in three brain areas affected in different stages of disease, to study potential relationships between these factors and pathological changes, as well as clinical symptoms. We showed increased oxidative damage in cortical neurons of patients AD compared to asDA and normal aging individuals, however, no signaling or DNA repair evidence. Also in the cortices, asDA individuals have close levels of biomolecules damage to normal aging individuals. Importantly, we found no change in damage markers and DNA repair gene products in the hippocampus, place of beginning of Alzheimer's neuropathology. It is possible that in the hippocampus DNA damage is compensated by other mechanisms unrelated to DNA repair. However, in the cortex is feasible that damage levels are decisive to the dementia triggering. Financial support: FAPESP, process n° 2009/02030-9.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Corte coronal do cérebro de um indivíduo com envelhecimento normal (A) e de paciente com DA (B).....	3
Figura 2	Representação esquemática do processamento da proteína precursora de amiloide (APP).....	6
Figura 3	Representação esquemática do envolvimento do BRCA1 na via de reparo HR.....	17
Figura 4	Representação esquemática da via de sinalização do p53.....	19
Figura 5	Representação esquemática do desenvolvimento do córtex cerebral.....	25
Figura 6	Demarcações por neurônio realizadas no ImageScope™ para a análise de marcação de núcleo e citoplasma.....	41
Figura 7	Parâmetros utilizados no algoritmo IHC nuclear v1, o qual está sendo utilizado para análise dos marcadores nucleares do presente trabalho.....	42
Figura 8	Teste de integridade do RNA das amostras do presente projeto.....	50
Figura 9	Imagem do TMA e imunohistoquímica (aumento de 20X) do marcador 8OHdG, evidenciando as marcações citoplasmáticas e nucleares.....	58
Figura 10	Imagem do TMA e imunohistoquímica (aumento de 20X) da forma fosforilada da histona γ H2AX, evidenciando as marcações nucleares.....	60

Figura 11	Imagem do TMA e imunohistoquímica (aumento de 20X) do marcador de oxidação de lipídios malondialdeído, evidenciando as marcações citoplasmáticas.....	61
Figura 12	Imagem do TMA e imunohistoquímica (aumento de 20X) do produto do gene supressor de tumor BRCA1, evidenciando a perda de especificidade do anticorpo.....	62
Figura 13	Imagem do TMA e imunohistoquímica (aumento de 20X) da proteína do supressor de tumor ATM, evidenciando as fracas marcações nucleares.....	63
Figura 14	Imagem do TMA e imunohistoquímica (aumento de 20X) da proteína pró-apoptótica p53, evidenciando as fracas marcações nucleares.....	64
Figura 15	Imagem do TMA e imunohistoquímica (aumento de 20X) da proteína do supressor de tumor PARP1, evidenciando a intensa imunoreatividade citoplasmática e a fraca imunoreatividade nuclear.....	65
Figura 16	Imagem do TMA e imunohistoquímica (aumento de 20X) da proteína do supressor de tumor PTEN, evidenciando a intensa imunoreatividade nuclear.....	67
Figura 17	Imagem do TMA e imunohistoquímica (aumento de 20X) da proteína do supressor de tumor Rb, evidenciando a imunoreatividade nuclear.....	68
Figura 18	Distribuição beta dos escores dos indivíduos DA, asDA e de envelhecimento normal em relação ao marcador de dano oxidativo 8OHdG no núcleo neuronal.....	69

Figura 19	Distribuição beta dos escores dos indivíduos DA, asDA e de envelhecimento normal em relação ao marcador de dano oxidativo 8OHdG no citoplasma neuronal.....	69
Figura 20	Distribuição beta dos escores dos indivíduos DA, asDA e de envelhecimento normal em relação ao marcador de dano oxidativo γ H2AX.....	70
Figura 21	Distribuição beta dos escores dos indivíduos DA, asDA e de envelhecimento normal em relação ao marcador de dano oxidativo malondialdeído.....	70
Figura 22	Distribuição beta dos escores dos indivíduos DA, asDA e de envelhecimento normal em relação ao supressor de tumor ATM.....	71
Figura 23	Distribuição beta dos escores dos indivíduos DA, asDA e de envelhecimento normal em relação ao supressor de tumor p53.....	71
Figura 24	Distribuição beta dos escores dos indivíduos DA, asDA e de envelhecimento normal em relação supressor de tumor PARP1 nuclear.....	72
Figura 25	Distribuição beta dos escores dos indivíduos DA, asDA e de envelhecimento normal em relação supressor de tumor PARP1 citoplasmático.....	72
Figura 26	Distribuição beta dos escores dos indivíduos DA, asDA e de envelhecimento normal em relação supressor de tumor PTEN.....	73
Figura 27	Distribuição beta dos escores dos indivíduos DA, asDA e de envelhecimento normal em relação ao supressor de tumor RB1.....	73
Figura 28	Representação gráfica da expressão gênica relativa dos supressores de tumor dos três grupos analisados.....	76

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Características das amostras de FFPE selecionadas.....	34
Quadro 2	Características das amostras de congeladas selecionadas, demonstrando a equivalência com as amostras FFPE.....	35
Quadro 3	Mapa de localização das amostras no TMA construído para o presente estudo.....	38
Quadro 4	Anticorpos utilizados para os danos de biomoléculas e supressores de tumor, com suas respectivas especificações.....	40
Quadro 5	Exemplo de matriz para obtenção dos escores finais, obtidos a partir dos dados de saída do Aperio (marcadores nucleares) e observações do patologista (marcadores citoplasmáticos).....	44
Quadro 6	Sequência dos <i>primers</i> e condições de PCR utilizados.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Análise descritiva das amostras FFPE estudadas.....	56
Tabela 2	Probabilidades calculadas a partir da análise bayesiana (FBST) na comparação dos escores para os marcadores de danos de biomoléculas e reparo de DNA.....	57
Tabela 3	Probabilidades de um grupo ter maior marcação forte que outro grupo, calculadas por região analisada, com base na distribuição beta.....	75
Tabela 4	Estatística descritiva das amostras congeladas investigadas no presente estudo.....	76
Tabela 5	Estatística da descritiva e p-valor da comparação da expressão mensurada por meio do RT-qPCR entre os três grupos estudados.....	78
Tabela 6	Estatística da descritiva e p-valor da comparação da expressão mensurada por meio do RT-qPCR entre o grupo com patologia da DA e os indivíduos com envelhecimento normal.....	79
Tabela 7	Estatística da descritiva e p-valor da comparação da expressão mensurada por meio do RT-qPCR entre os indivíduos com envelhecimento normal e os pacientes DA sintomáticos.....	79

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

8-OHG	8-hidróx-2-deoxiguanidina
A	Nucleotídeo adenina
AIF	Fator de indução a apoptose; do inglês <i>Apoptosis inductor factor</i>
Apo* ϵ 4	Alelo 4 do gene da apolipoproteína E
ApoE	Gene da apolipoproteína E
APP	Gene da proteína precursora de amiloide; do inglês <i>Amilóide precursor protein</i>
asDA	Doença de Alzheimer assintomática
ATM	Gene da ataxia telangiectasia mutado; do inglês – <i>ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	Trifosfato de adenosina; do inglês – <i>Adenosine-5'-triphosphate</i>
ATR	Gene ataxia telangiectasia and Rad3 related
A α	Peptídeo amilóide a, produto da clivagem do gene APP pela α secretase/ γ secretase
A β	Amilóide beta
BCL-2	Família gênica pró-apoptótica linfoma de células 2 – B; do inglês – <i>B-cell lymphoma 2</i>
BEHGEEC	Banco de Encéfalos Humanos do Grupo de Estudos de Envelhecimento Cerebral
BER	Reparo por excisão de bases; do inglês – <i>Base excision repair</i>
BRCA1	Gene do câncer de mama 1; do inglês – <i>breast cancer 1</i>
C	Nucleotídeo citosina
Ca ⁺² ,	Íon cálcio
cAMP	Adenosina monofosfato cíclica; do inglês – <i>Cyclic adenosine monophosphate</i>
CDKIs	Inibidores de cinases dependentes de ciclina; Do inglês - <i>Ciclin-dependent kinases inhibitors</i>
CDKs	Cinases dependentes de ciclina; Do inglês - <i>Ciclin-dependent kinases</i>
CERAD	Consórcio para estabelecer um registro da doença de Alzheimer; do inglês – CERAD (Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease)
CHK2	Gene CHK2 checkpoint homolog
CO3	Radical livre Radical Carbonato

CREB	Proteína do elemento de ligação em resposta a cAMP; Do inglês – cAMP response element-binding protein
DA	Doença de Alzheimer
DNA	Ácido desoxirribonucleico; do inglês – <i>Desoxibonucleic acid</i>
DNA-PKcs	Proteína cinase de serina/ treonina DNA dependente; do inglês – <i>DNA-dependent serine/threonine protein kinase</i>
CE	Córtex entorrinal
E2F-1	Fator de transcrição E2F1
EOAD	Doença de Alzheimer precoce; do inglês – <i>Early-onset alzheimer disease</i>
ERCC	Gene de reparo por excisão de complemento cruzado; do inglês – <i>excision repair cross-complementing</i>
ERK1/2	Cinase regulada por sinal extracelular; do inglês – <i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
FAD	Doença de Alzheimer familiar; do inglês – <i>Familial Alzheimer's disease</i>
G	Nucleotídeo guanina
G1	Fase de crescimento 1 do ciclo celular; do inglês – Gap 1 phase
GADD45	Gene parada de crescimento e induzido por dano de DNA; do inglês – <i>growth arrest and DNA-damage-inducible</i>
GSK-3 β	Gene da cinase glicogênio sintase 3 beta; do inglês – <i>glycogen synthase kinase 3 beta</i>
GWAS	Estudos de associação ampla de genoma; do inglês – <i>Genome-wide association study</i>
H	Hipocampo
H2A	Histona 2A
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LOAD	Doença de Alzheimer tardia; do inglês – <i>Late-onset alzheimer disease</i>
MCI	Comprometimento cognitivo leve; Do inglês - <i>Mild cognitive Impairment</i>
MDA	Malondialdeído
MDM2	Gene murine doble minute 2
miRNAs	Pequenos ácido ribonucleicos; do inglês – <i>micro ribonucleic acid</i>
Mre11	Gene da proteína de reparo meiótico por recombinação homologa A; do inglês – <i>meiotic recombination 11 homolog A</i>
N	Indivíduos com envelhecimento normal
NAD ⁺	Dinucleotídeo adenina nicotinamida; do inglês – <i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>

Nbs1	Gene da proteína de reparo da síndrome de quebra de Nijmegen 1; do inglês – <i>Nijmegen breakage syndrome 1</i>
NER	Reparo por excisão de bases; do inglês – <i>Nucleotide Excision Repair</i>
NFT	Emaranhados neurofibrilares; do inglês – <i>Neurofibrillary tangles</i>
NFκB	Fator nuclear Kappa B; do inglês – <i>factor nuclear kappa B</i>
OH	Radical hidroxila
P21WAF/ Cip1	Gene do Inibidor de cinase ciclina-dependente 1A; do inglês – <i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1A</i>
p53	Produto do gene TP53
PARP1	Polimerase poli [ADP-ribose] 1; do inglês – <i>Poly [ADP-ribose] polymerase 1</i>
PIKK	Família de proteínas Fosfatidil inositol 3- cinase; do inglês – <i>phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) like kinase</i>
PIP ₂	fosfatidilinositol 3,4 bifosfato; do inglês – <i>Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i>
PIP ₃	fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato; do inglês – <i>Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate</i>
PKB/AKT	Gene do homologo 1 do oncogene murino timona viral v-akt; do inglês – <i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>
PTEN	Gene homologo a fosfatase e tensina; do inglês – <i>phosphatase and tensin homolog</i>
Rad50	Gene da proteína de reparo Rad50
RB1	Gene do retinoblas
RNA	Ácido ribonucleico; do inglês - <i>Ribonucleic acid</i>
RO ₂	Radical livre peroxílico RO ₂
ROS	Espécies reativas de oxigênio; do inglês - <i>Reactive oxygen species</i>
Ser139	Resíduo de serina posição 139
SVOC	Serviço de Verificação de Óbitos da Capital
T	Nucleotídeo timina
CT	Córtex temporal
TP53	Gene TP53
Tyr142	Resíduo de tirosina posição 142
ZV	Zona ventricular
ZSV	Zona sub-ventricular
λ-H2AX	Histona 2A fosforilada

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	A doença de Alzheimer.....	1
1.2	Manifestações clínicas.....	1
1.3	Epidemiologia.....	2
1.4	Fisiopatologia.....	3
1.5	Patogênese da doença de Alzheimer.....	7
1.5.1	Fatores genéticos e epigenéticos.....	7
1.5.2	Hipótese Amiloidogênica.....	9
1.5.3	Outros eventos possivelmente patogênicos.....	10
2	OBJETIVOS	28
3	MATERIAL E MÉTODO	29
3.1	Caracterização da amostra.....	29
3.1.1	Avaliação Neuropatológica.....	29
3.1.2	Avaliação Clínica.....	30
3.2	Recepção e seleção de casos – Banco de encéfalos da FMUSP.....	30
3.3	Coleta e armazenamento.....	32
3.4	Amostras selecionadas.....	33
3.4.1	Amostras em FFPE.....	33
3.4.2	Amostras congeladas.....	34
3.5	Avaliação de danos de biomoléculas.....	35
3.6	Avaliação da expressão dos genes supressores de tumor.....	36
3.7	Imunohistoquímica.....	36
3.7.1	Construção do Tissue microarray.....	36
3.7.2	Reações de imunohistoquímica.....	39
3.7.3	Análise Estatística.....	43
3.8	PCR em Tempo Real – RT-QPCR.....	46
3.8.1	Extração de RNA.....	47
3.8.2	Quantificação do RNA total.....	48

3.8.3	Avaliação da Integridade do RNA total.....	49
3.8.4	Síntese de cDNA.....	49
3.8.5	Avaliação das linhagens.....	52
3.8.6	Desenho dos oligonucleotídeos para o RT-qPCR.....	52
3.8.7	RT-qPCR.....	52
3.8.8	Análise Estatística.....	55
5	RESULTADOS	56
5.1	Amostras FFPE.....	56
5.1.1	Imunohistoquímica.....	56
5.1.2	Análise de verossimilhança.....	68
5.2	Amostras congeladas.....	75
5.2.1	RT-qPCR.....	75
6	DISCUSSÃO.....	79
6.1	Dano.....	79
6.2	Reparo de DNA.....	88
7	CONCLUSÃO	102
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103

1 INTRODUÇÃO

1.1 A DOENÇA DE ALZHEIMER

A doença de Alzheimer (DA) foi primeiramente relatada há mais de 100 anos, porém as pesquisas relacionadas aos sintomas, causas, fatores de risco e tratamento foram iniciadas apenas nos últimos 30 anos (Alzheimer's Association 2011; CIPRIANI et al. 2011). A DA é uma doença degenerativa cerebral primária, de etiologia ainda desconhecida, com características neuropatológicas e neuroquímicas próprias. É caracterizada neuropatologicamente pela presença de depósitos extraneuronais compostos da proteína amilóide e modificações fibrilares intraneuronais da proteína Tau (World Health Organization-WHO 2012).

1.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Há uma grande variação na apresentação clínica de anormalidades cognitivas e neuropsicológicas. Os principais sintomas do início da doença são: dificuldade de lembrar nomes ou fatos recentes, apatia e depressão. Os sintomas tardios são dificuldade de raciocínio, planejamento e resolução de problemas; dificuldade em completar tarefas; desorientação de tempo e espaço; mudanças de comportamento; e dificuldade em falar, andar e deglutir (Alzheimer's Association 2011).

1.3 EPIDEMIOLOGIA

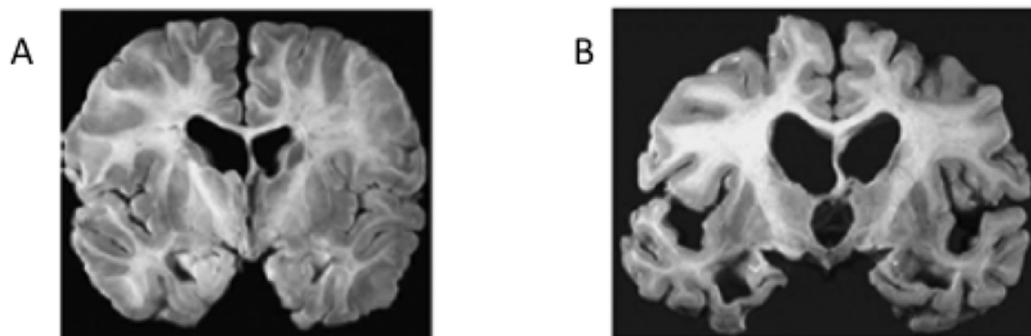
Segundo dados da Organização Mundial de Saúde-OMS, a DA tem uma prevalência mundial de 5% após os 65 anos, com aumento de cerca de 30% em idosos com 85 anos ou mais. Nos estados Unidos, a DA é a sexta principal morbidade que leva morte e a única entre as dez mais prevalentes que não pode ser evitada, curada ou até mesmo retardada. Com base em dados de mortalidade dos anos de 2000 a 2008, as taxas de mortalidade têm diminuído para a maioria das doenças mais importantes, entretanto as mortes por DA aumentaram 66% durante o mesmo período. Em 2011, 13% dos indivíduos acima de 65 foram acometidos pela DA, e dentre os indivíduos com mais de 85 anos de idade, 43% desenvolveram a doença. Dos pacientes com DA, estima-se que 4% têm idade menor que 65 anos, 6% idade de 65 a 74 anos, 45% têm idade de 75 a 84 anos, e 45% têm 85 anos ou mais (Alzheimer's Association 2011).

No Brasil, o processo de envelhecimento tem sido mais acelerado que em outros países, resultado da mudança da fecundidade e expectativa de vida. Dessa forma, a população idosa brasileira, que em 1980 compunha 6%, até o ano de 2011 compôs 10% da população total (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE 2011). Ainda, projeções estatísticas do IBGE preveem um aumento de 87,4%, entre 2010 e 2030, e 298,2%, entre 2030 e 2050, da população idosa (60 anos ou mais) (LEITE 2011). Em relação à DA, estudos brasileiros apresentam prevalência próxima aos estudos internacionais. No trabalho de HERRERA et al. (2002), foram estudados 1656 indivíduos com mais de 65 anos, destes, 118 (7,1%) indivíduos apresentavam algum tipo de demência. Dos 118 indivíduos dementados, 65 (3,9%)

indivíduos foram classificados como provável/possível DA. A taxa de incidência anual de demência foi de 13,8 casos por 100.000 habitantes/ano e de DA, 7,7 casos por 100.000 habitantes/ano.

1.4 FISIOPATOLOGIA

O cérebro dos pacientes com DA apresenta-se com atrofia cortical em graus variáveis, com alargamento dos sulcos e redução dos giros cerebrais (Figura 1). Na grande maioria dos casos, todas as áreas cerebrais são acometidas, principalmente áreas do lobo temporal como amígdalas e hipocampo. Microscopicamente, há uma perda significativa de neurônios, aliado ao encolhimento de grandes neurônios corticais (YAARI e COREY-BLOOM 2007).



Fonte: Adaptado de YAARI E COREY-BLOOM (2007).

Figura 1 - Corte coronal do cérebro de um indivíduo com envelhecimento normal (A) e de paciente com DA (B)

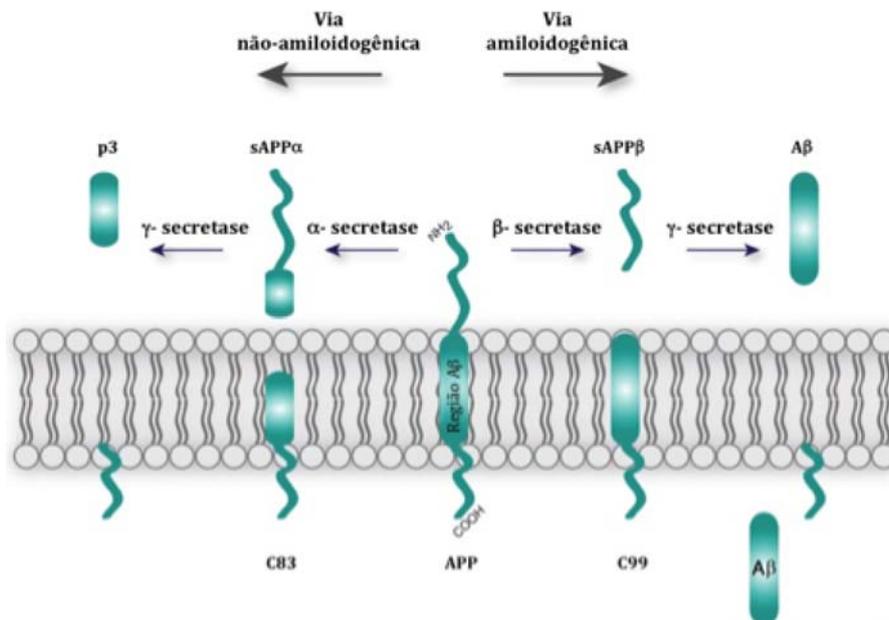
O processo patogênico é iniciado nas áreas límbicas do lobo temporal, mais especificamente no hipocampo e córtex entorrinal (BRAAK e BRAAK 1991). Neuropatologicamente, a DA é caracterizada pelas placas senis e os emaranhados

neurofibrilares. Essas lesões, ainda, podem ser encontradas, nas mesmas proporções em indivíduos com ausência de qualquer sintoma clínico, assim como, em menor extensão e distribuição, no tecido cerebral de indivíduos com envelhecimento normal (GOEDERT e SPILLANTINI 2006; BENNETT et al. 2006; DRISCOLL e TRONCOSO 2011).

As placas senis são depósitos extracelulares compostos principalmente pela peptídeo amiloide beta ($A\beta$), que contém de 40 a 42 aminoácidos e é derivada de um processamento proteolítico sequencial da proteína precursora de amiloide (APP). A APP é metabolizada por duas diferentes vias. A via principal é iniciada com a clivagem da α -secretase e posterior clivagem da γ -secretase, resultando num peptídeo não amiloidogênico, $A\alpha$. Na via alternativa do metabolismo da APP é gerado o peptídeo $A\beta$ por uma clivagem sequencial β -secretase e γ -secretase (Figura 2). O peptídeo $A\beta$ está relacionado com o crescimento axonal (CHASSEIGNEAUX et al. 2011) e é essencial durante a embriogênese humana para o desenvolvimento cerebral normal. Esse peptídeo induz uma diferenciação de células precursoras neuronais de forma mais rápida e eficiente que o peptídeo $A\alpha$ (HARTMANN et al. 1999; HERMS et al. 2004; GUENETTE et al. 2006; FREUDE et al. 2011). Por outro lado, sabe-se que o peptídeo $A\beta$ apresenta neurotoxicidade relacionada com a DA (BEKRIS et al. 2010; CHASSEIGNEAUX e ALLINQUANT 2012). Alguns trabalhos, a partir de pesquisas de formas de amilóide sintéticas (beta oligômeros), indicam que a conformação do peptídeo $A\beta$, assim como o equilíbrio entre as formas fibrilares e protofibrilares do próprio peptídeo têm um papel mais importante na toxicidade neuronal do que as placas amilóides formadas (SIMMONS et al. 1994; LORENZO e YANKNER 1994). Entretanto, estudos recentes têm demonstrado que

pequenos oligômeros solúveis tais como dímeros, trímeros e dodecameros, formados durante a agregação de A β , são as principais causas da toxicidade de A β e da patogênese da DA (WALSH e SELKOE 2004; LESNÉ et al. 2006; HUNG et al. 2008; SHANKAR et al. 2008).

Na DA familiar *Familial Alzheimer's Disease* (FAD), há um aumento da clivagem que gera o peptídeo A β por alterações nos genes da APP e Presenilinas (BEKRIS et al. 2010). Na DA esporádica, alguns trabalhos vêm tentando explicar o mecanismo de aumento do peptídeo A β . MINERS et al. (2008), associou os níveis de A β com a deficiência de enzimas que degradam esse peptídeo. No mesmo ano, outra pesquisa verificou o aumento dos níveis de β -secretase, por uma deficiência de miRNAs que controlam sua expressão (HÉBERT et al. 2008). Além deste, outros trabalhos vêm demonstrando a alteração da expressão ou a perda de sítios de miRNA relacionado com a expressão de A β na DA familiar e esporádica (COGSWELL et al. 2008; WANG et al. 2008; HÉBERT et al. 2008; BOISSONNEAULT et al. 2009; GEEKIYANAGE e CHAN 2011; LONG e LAHIRI 2011; FANG et al. 2012). Interessantemente, SCHONROCK et al. (2011) apresentaram o impacto da patologia da DA no metabolismo cerebral, demonstrando a desregulação de miRNA em resposta à toxicidade do peptídeo A β .



Fonte: Adaptado de CAVALLUCCI et al. (2012)

Figura 2 - Representação esquemática do processamento da proteína precursora de amiloide (APP).

As lesões neurofibrilares são compreendidas pelos emaranhados neurofibrilares (NFT - *neurofibrillary tangles*), que se localizam nos corpos celulares e dendritos apicais; assim como os filamentos dos neurópilos (*neuropil threads*), que se localizam na porção distal dos dendritos. As lesões neurofibrilares são achados intraneuronais compostos por filamentos helicoidais pareados de proteína tau. A tau pertence à família de proteínas microtúbulos-associadas. No desenvolvimento neuronal, a proteína tau migra para os axônios, onde exerce a função de estabilização dos microtúbulos. Ainda, sabe-se que a tau contém um grande número de sítios de fosforilação (CHEN et al. 2004). Em homeostase, a média é de 2 a 3 mols fosfato por mol de tau, entretanto, em condições patológicas, essa média aumenta para até 8 mols de fosfato por mol de tau (KOPKE et al. 1993). Essa modificação é chamada de hiperfosforilação, onde alguns sítios são fosforilados em altos graus. Além disso, a

tau sofre uma mudança conformacional que provavelmente auxilia na fosforilação (JICHA et al. 1997). A hiperfosforilação é crítica para a tau se dissociar dos microtúbulos, causando colapso da estrutura, e inicia-se o processo de acúmulo nos dendritos (AVILA et al. 2006).

Em adição à complexidade desta doença, alguns indivíduos cognitivamente saudáveis revelaram uma extensa presença de emaranhados neurofibrilares e placas senis no córtex cerebral, indicando a possibilidade de um estado de resiliência, ou um estado assintomático da DA (Doença de Alzheimer assintomática-asDA). A classificação dos indivíduos asDA foi estabelecida numa publicação consenso em 2009 por um consórcio de hospitais e centros de pesquisa em envelhecimento detalhando essa condição em indivíduos idosos e cognitivamente saudáveis (PRICE et al. 2009).

1.5 PATOGÊNESE DA DOENÇA DE ALZHEIMER

A DA é provavelmente causada por uma complexa interação de múltiplos fatores genéticos, epigenéticos e ambientais. Entretanto, o que dispara a cascata patogênica na DA ainda permanece desconhecido.

1.5.1 Fatores genéticos e epigenéticos

Geneticamente, a DA é dividida em duas formas: i) DA precoce, que se apresenta em pacientes com 60 anos ou menos de (*Early-onset alzheimer disease*-EOAD); ii) DA tardia, que acomete os indivíduos com mais de 60 anos, e faz parte

da maioria dos casos de DA, com mais de 93% de todos os casos de DA (*Late-onset alzheimer disease* – LOAD) (SWERDLOW 2007).

A forma esporádica representa a maioria dos casos de LOAD e a forma familiar representa a maioria dos casos de EOAD. Entretanto, ambos aparentam ter componentes genéticos.

A EOAD é causada por mutações em três genes (APP; PSEN1 e PSEN2), raras e de alta penetrância (BEKRIS et al. 2010; BERTRAM et al. 2010; GOATE e HARDY 2012). A EOAD soma de 1 a 6% de todos os casos de DA em indivíduos de 30 a 60/65 anos (BEKRIS et al. 2010).

A LOAD é geneticamente a forma mais complexa de DA. Pensa-se que a susceptibilidade da LOAD é conferida por muitos fatores de risco genético de alta frequência, porém baixa penetrância. Enquanto a predisposição é também por vezes referida como “esporádica”, é importante enfatizar que até 60% a 80% dessa forma de DA é definida geneticamente (GATZ et al. 2006). Entretanto, o componente genético da LOAD que evidencia um ou mais genes causativos da DA ainda não foi elucidado. Estudos de genes candidatos encontrados por meio de resultados de estudos de ligação genética (linkage), levaram à descoberta da apolipoproteína E (ApoE), fator de risco mais conhecido para LOAD (BERTRAM et al. 2010). Sabe-se que o alelo Apo* ϵ 4 deste gene estabelece um risco de 3 a 4 vezes maior de desenvolvimento da DA, quando comparado com os outros alelos (BLACKER et al. 1997; ASHFORD 2004). Recentemente, genotipando mais de 7 mil pacientes com DA, e 10 mil controles, com mais de 85 anos de idade, GENIN et al. (2011) encontraram um risco de morte de 51% em homens e 60% em mulheres, ambos portadores dos dois alelos Apo* ϵ 4. Entretanto, os mecanismos pelos quais o alelo

Apo*ε4 altera os riscos de desenvolvimento de DA ainda não está bem estabelecido. De fato, mais de 50% dos pacientes com DA não possuem esse alelo Apo*ε4, e 20% dos que possuem esse alelo não desenvolvem a DA (KHACHATURIAN et al. 2004).

Mecanismos epigenéticos também parecem constituir um importante papel na patogênese da DA. Estudos com amostras de tecido cerebral *post mortem* de pacientes com DA, leucócitos, assim como modelos de animais transgênicos demonstram que o envelhecimento e a DA estão associados com desregulação epigenética (CHOULIARAS et al. 2010; DAY e SWEATT 2011). Recentes trabalhos vêm discutindo fortes evidências que suportam o papel da epigenética no desenvolvimento da DA e o papel dessas nas potenciais vias e mecanismos envolvidos na patogênese (CHOULIARAS et al. 2010; BIHAQI et al. 2012).

1.5.2 Hipótese Amiloidogênica

A proposta mais difundida sobre a patogênese da DA é a hipótese amiloidogênica, onde a presença do peptídeo Aβ é a causa de todas as outras alterações e, por fim, da própria DA. (HARDY e ALLSOP 1991; HARDY e HIGGINS 1992; HARDY e SELKOE 2002; LEE et al. 2004). Essa hipótese foi formulada após algumas evidências. O peptídeo Aβ é gerado através da clivagem proteolítica da proteína do gene APP que reside no cromossomo 21. Assim como na DA, esse peptídeo encontra-se também acumulado em placas, nos pacientes com a síndrome de Down, trissomia do cromossomo 21 (GLENNER e WONG 1984; MASTERS et al. 1985).

Após 20 anos, outros trabalhos continuam dando suporte a essa teoria, com estudos mostrando a toxicidade de Aβ (WALSH e SELKOE 2004, 2007), estudos de

associação através de GWAS (Estudos de associação ampla de genoma; do inglês – *Genome-wide association study*) (ROGAEVA et al. 2007; HAROLD et al. 2009; JUN et al. 2010), ou ainda demonstrando a ligação entre a ApoE e a homeostase de A β (CASTELLANO et al. 2011). Entretanto, outras evidências levantam questionamentos sobre essa teoria. Está comprovado que a deposição do amiloide não só está presente na DA, mas também parece iniciar a alteração em outras doenças neurodegenerativas como as demências familiares britânica e dinamarquesa, com angiopatia amilóide (SELKOE et al. 1997, 2001; MEAD et al. 2000; HOLTON et al. 2001, 2002; REVESZ et al. 2009). Outro fator já bastante descrito na literatura é que a doença amilóide pode ocorrer no cérebro humano, por anos, senão por décadas, sem causar prejuízo cognitivo ou neurodegeneração (PRICE e MORRIS 1995; TRONCOSO et al. 1998; GODBOLT et al. 2004; BENNETT et al. 2006; SPERLING et al. 2011). Sendo assim, mesmo que o peptídeo A β constituísse a patologia primária, não seria suficiente para disparar todo processo patológico da DA. Ainda, os questionamentos sobre a hipótese amiloide é que, na maioria dos pacientes com DA, o motivo da mudança na produção de A β é desconhecida. Dessa forma, pensa-se que o processamento da APP e os mecanismos de produção de A β são processos extremamente controlados por eventos fisiológicos prévios (SWERDLOW 2012).

1.5.3 Outros eventos possivelmente patogênicos

Além da hipótese amiloidogênica, outros eventos moleculares vêm sendo descritos como possivelmente patogênicos, como modificações mitocondriais, estresse oxidativo, danos de DNA e reentrada no ciclo celular.

A hipótese da disfunção mitocondrial foi proposta em 2004 e postula que alterações nos mecanismos fisiológicos das mitocôndrias desencadeiam os outros processos patológicos subjacentes da DA (SWERDLOW e KHAN 2004).

As mitocôndrias têm papel essencial em muitas funções celulares, como geração de ATP, homeostase de Ca^{+2} , formação de espécies reativas de oxigênio (*Reactive oxygen species – ROS*) e apoptose. Os neurônios são particularmente dependentes das mitocôndrias devido a grande demanda de energia. Portanto, o tecido nervoso e, dessa forma, os neurônios, são relativamente intolerantes à disfunção mitocondrial (LEZY e SWERDLOW 2012). Vários trabalhos vêm associando a disfunção mitocondrial com a DA, não só em neurônios, mas em outros tipos celulares, como plaquetas e fibroblastos (DAVIS et al. 1997; CURTI et al. 1999; BOSETTI et al. 2002; MANCUSO et al. 2003; CARDOSO et al. 2004). Essa observação indica que a disfunção mitocondrial ocorre de forma sistêmica e, assim, pode ser que não represente simplesmente uma consequência da neurodegeneração (SWERDLOW 2007, 2012; LEZY e SWERDLOW 2012). Essa hipótese presume que a EOAD e a LOAD não são etiologicamente homogêneas, mas convergentes. Na EOAD o aumento nos níveis do peptídeo $A\alpha$ por mutações nos genes APP e secretases, é a principal causa das disfunções mitocondriais. Na LOAD, assim como mencionado anteriormente, a deposição de $A\beta$ não é suficiente para desencadear todos os eventos patogênicos da DA, entretanto, como demonstrado em ensaios com *cíbridos*, células com funções mitocondriais alteradas têm um aumento da produção de $A\beta$ (KHAN et al. 2000; SWERDLOW e KHAN 2004; SWERDLOW 2012).

Mesmo em indivíduos idosos normais, o tecido cerebral é particularmente suscetível ao estresse oxidativo pelo alto consumo de oxigênio, abundância de ácidos

graxos poliinsaturados e lipídios, e limitada capacidade antioxidante em relação a outros tecidos (LOVELL e MARKESBERY 2007a e b). O estresse oxidativo ocorre quando os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS – *Reactive oxygen species*) excedem a capacidade antioxidante da célula, levando ao dano de proteínas de membrana e citoplasma, lipídios e ácidos nucleicos, comprometendo funções celulares. A ação antioxidante na célula é realizada por antioxidantes naturais como a superóxido dismutase, catalases e glutatona (LOVELL e MARKESBERY 2007a e b; SWERDLOW 2012).

A associação da DA com danos oxidativos vem sendo amplamente estudada desde a década de 80 (MARTINS et al. 1986). Em 2001, NUNOMURA et al. demonstraram a presença de dano oxidativo precedendo a patologia da DA, NFTs e placas A β . Vários estudos demonstraram que o dano oxidativo de DNA/RNA (MECOCCI et al. 1994, 1998; LOVELL et al. 1999; NUNOMURA et al. 1999, 2001, 2004; SHAN et al. 2003; GACKOWSKI et al. 2008), modificações proteicas (LOVELL et al. 2000; POCERNICH e BUTTERFIELD 2003; DING et al. 2006; SULTANA et al. 2006; SHAO et al. 2008) e geração de produtos de peroxidação de lipídios (MARKESBERY e LOVELL 1998; LOVELL et al. 2001; MCGRATH et al. 2001) estão significativamente aumentados nos estágios avançados da DA, em relação a indivíduos com envelhecimento normal. Ainda, marcadores de estresse oxidativo vêm sendo descritos em pacientes com alterações cognitivas leves e em asDA (MARKESBERY et al. 2005; DING et al. 2006; BUTTERFIELD et al. 2006a e b; WANG et al. 2006; WILLIAMS et al. 2006; SHAO et al. 2008; ALUISE et al. 2010; BRADLEY et al. 2010; LOVELL et al. 2011; TORRES et al. 2011; BRADLEY et al. 2012).

O efeito de ROS pode levar à formação de mais de 20 adultos, sendo o mais estabelecido, e comumente mensurado como um sensível marcador de dano de DNA, o 8-hydroxy-2-deoxyguanosina (8-OHdG) (DIZDAROGLU et al. 2002; VALAVANIDIS et al. 2009). O 8OHdG é formado pela interação de diversas espécies reativas ($\text{OH}\cdot$, $\text{CO}_3\cdot^-$, $\text{RO}_2\cdot$) com bases nucleotídicas. Sua presença pode levar a diversos tipos de mutação, sendo as mais importantes as transversões GC→TA (HALLIWELL e GUTTERIDGE 2007; VALAVANIDIS et al. 2009). Estudos demonstraram um sensível aumento desse marcador em zonas neocorticais de indivíduos com alterações cognitivas leves e pacientes com DA (WANG et al. 2006; LOVELL e MARKESBERY 2007b), assim como seu aumento em fluidos biológicos (MECOCCI et al. 1998; TEUNISSEN et al. 2002; DORSZEWSKA et al. 2005, 2009; LEE et al. 2007; GACKOWSKI et al. 2008).

A resposta celular a danos ao DNA, também induzidos por ROS, envolve a ativação de proteínas associadas à quebra de dupla fita de DNA. A fosforilação da histona H2AX constitui uma medida indireta desses danos. A histona H2AX é um membro evolutivamente conservado da família de histonas H2A. Em resposta a quebras de dupla fita, esta histona é rapidamente fosforilada no resíduo Ser139 e Tyr142 da porção C-terminal por cinases da família PI3KK, como ATM, ATR e outras DNA-PKcs, dando origem à forma λ -H2AX (LOWNDES e TOH 2005; PINTO e FLAUS 2010). Na DA, a presença de danos ao DNA mensurados através da expressão de λ -H2AX foi demonstrada em astrócitos de pacientes com a DA em relação a indivíduos com envelhecimento normal (SIMPSON et al. 2010).

Em adição aos danos por ROS, o DNA também pode ser modificado por subprodutos aldeídos da peroxidação de lipídios. Devido à alta reatividade dos

aldeídos α e β , pode ocorrer a reação com a desoxguanidina formando o aduto exocíclico 1-N²-propanodeoxiguanosina. Esse aduto pode promover ligações cruzadas DNA-DNA e DNA-proteína (LOVELL e MARKESBERY 2007a). A peroxidação de lipídios pode ser particularmente importante na DA e no envelhecimento. O cérebro possui altos níveis de lipídios polinsaturados e, dessa forma, é suscetível à reação em cadeia de radicais livres da peroxidação de lipídios (HALLIWELL 1992). Um dos produtos resultante natural da peroxidação de lipídios é o Malondialdeído – MDA. O MDA é um dialdeído de três carbonos, altamente reativo, formado naturalmente a partir da peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados e do metabolismo do ácido araquidônico. A peroxidação de lipídios foi amplamente demonstrada em pacientes com DA com outros adutos (SAYRE et al. 1997; MARKESBERY e LOVELL 1998; LOVELL et al. 2001; MARKESBERY et al. 2005; WILLIAMS et al. 2006; LOVELL et al. 2011).

Estudos anteriores realizados há cerca de 25 anos mostraram que fibroblastos, linfoblastos e linfócitos de pacientes com DA são deficientes no reparo de DNA induzidos por agentes alquilantes (LI e KAMINSKAS 1985; ROBISON et al. 1987; BRADLEY et al. (1989); Revisto por COPPEDÈ e MIGLIORE 2009). Na década passada, muitos trabalhos reportaram um decréscimo na atividade de algumas proteínas de reparo em MCI e DA, sugerindo que o reparo de DNA aberrante pode ser crucial para o processo neurodegenerativo (COPPEDÈ e MIGLIORE 2009). Ainda, foi relatado que, com reparo de DNA, há um aumento nos níveis dos produtos gênicos 80 e 89 de ERCC (*excision repair cross-complementing*), propondo a hipótese de que o cérebro de pacientes com DA é objeto de dano ao DNA por estresse oxidativo. A elevação dos produtos gênicos de reparo é uma tentativa de

aumentar a capacidade de reparo do DNA (HERMON et al. 1998). Entretanto, a capacidade de reparo foi evidenciada diminuída, podendo estar relacionada com a progressão de DA (LOVELL e MARKESBERY 2007a).

Desde as primeiras descobertas de dano oxidativo e diminuição da atividade de reparo por excisão de bases (*Base Excision Repair - BER*) (LOVELL et al. 1999; JACOBSEN et al. 2004), a via BER tem sido extensivamente estudada na DA e em MCI. BER é talvez o mecanismo de reparo mais fundamental de DNA em organismos superiores, e é de particular importância em tecidos pós-mitóticos, tais como no tecido cerebral, onde modificações de bases são mais prováveis de ocorrer do que grandes danos ao DNA (COPPEDÈ e MIGLIORE 2009).

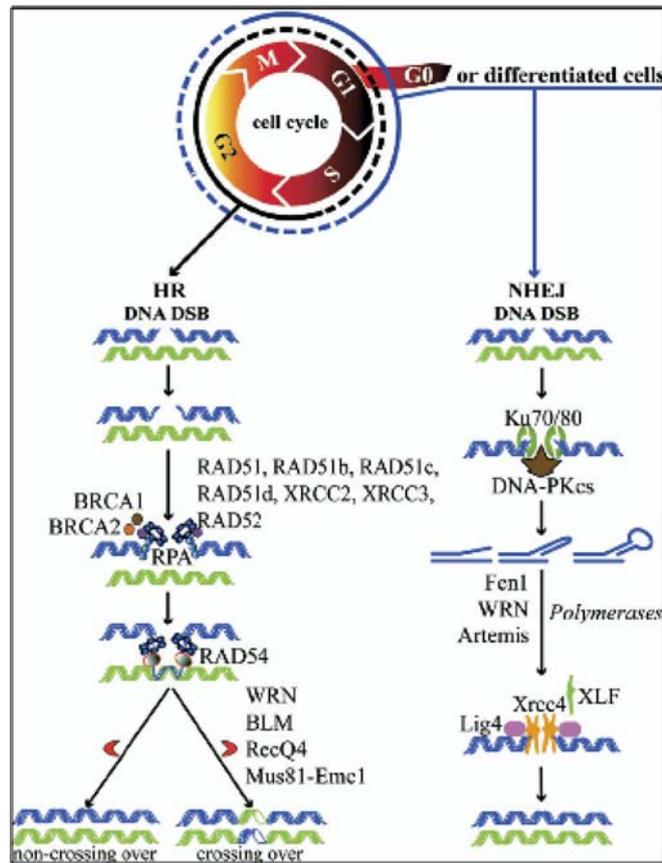
Apesar de BER ser o mecanismo principal para lidar com os danos gerados por estresse oxidativo, ambos os mecanismos de BER ou o reparo por excisão de nucleotídeos (*Nucleotide Excision Repair - NER*), mostraram-se alterados na DA (ZANA et al. 2007).

Existem tipos diferentes de reparo que podem ser realizados, que dependem da fase do ciclo em que a célula se encontra. A recombinação homóloga é predominante na fase S tardia e na passagem de G2/M do ciclo celular. Tanto o complexo de Mre11/Rad50/Nbs1 como BRCA1 são essenciais para este tipo de reparo. Já a recombinação não homóloga pode acontecer em qualquer fase do ciclo celular, como também em células diferenciadas. No entanto, ela é mais suscetível a erros (Figura 3).

A manutenção da integridade do DNA durante a replicação celular é fundamental. Existe um conjunto de genes que controlam o ciclo celular dependendo da integridade do DNA: os genes supressores de tumor. EVANS et al. (2007)

demonstraram relação entre o gene BRCA1 e DA. O BRCA1 (*Breast Cancer 1*) é um gene que codifica uma fosfoproteína nuclear que atua na manutenção da estabilidade genômica. É expresso em células em divisão durante o desenvolvimento; entretanto, está presente apenas em pequenas quantidades de neurônios diferenciados.

O produto do gene BRCA1 tem como função regular a transcrição, a progressão do ciclo celular e pode ainda ter um papel de manutenção da função do telômero, de forma que, a presença desse produto gênico pode indicar mudanças no ciclo celular e danos no DNA, ambas mudanças ocorridas na patogênese da DA. Como um supressor tumoral, desempenha papel de supressão do ciclo celular e de sobrevivência da célula. Sua presença pode ser um fator neuroprotetor que prolonga a vida da célula após a reentrada no ciclo celular, protegendo os neurônios de apoptose (RAINA et al. 2001a e b). Essas proteínas neuroprotetoras têm vindo na linha de frente como candidatos moleculares para discriminar envelhecimento normal e patológico (EVANS et al. 2007). Alguns estudos vêm sugerindo um significativo papel de BRCA1 na rede de defesa contra toxicidade relacionada com estresse oxidativo.



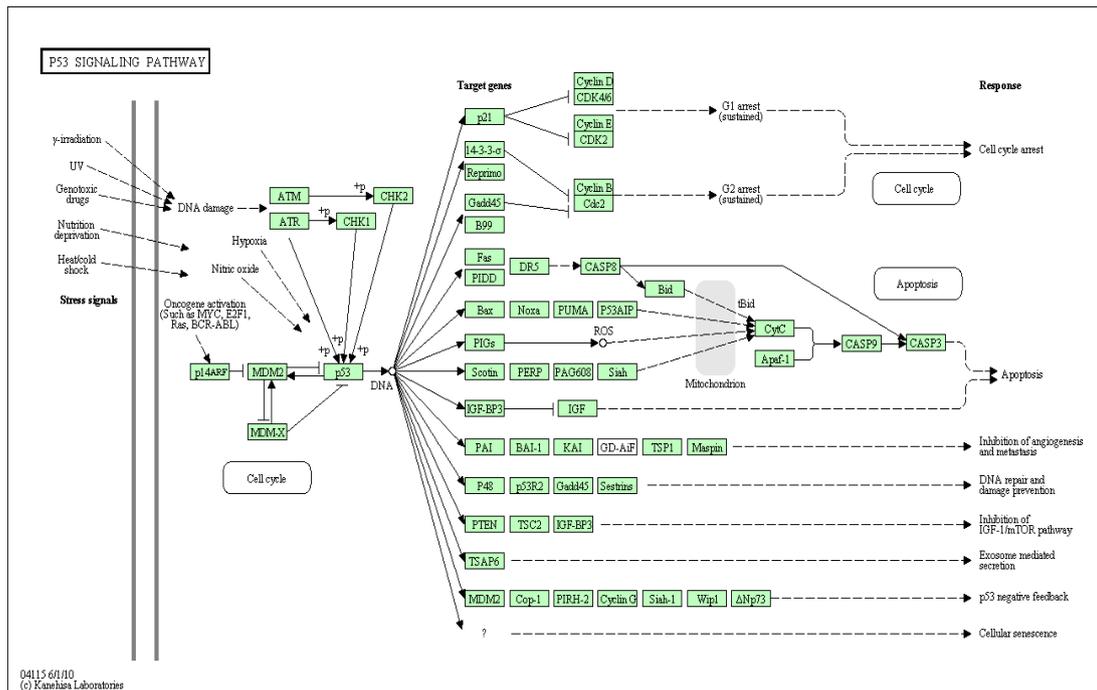
Fonte: Adaptado de LEE e MCKINNON (2007)

Figura 3 - Representação esquemática do envolvimento do BRCA1 na via de reparo de recombinação homóloga.

O gene *ATM* (*ataxia telangiectasia mutated*) codifica um produto da família fosfatidilinositol-3 cinase. Nenhum trabalho ainda associou diretamente este gene com DA. Entretanto, *ATM* e *ATR* (*ATM and Rad3-related*) são ativados em resposta ao dano de DNA e a mudanças no estado redox intracelular (GUO et al. 2010). Essa ativação por dano pode ocorrer em 2 vias: i) ativação direta, pela ligação direta no dano de DNA; e ii) ativação indireta, pela interação de proteínas de reparo ou manutenção de DNA (YANG et al. 2004). A autofosforilação no resíduo S1981, fosforilação da proteína p53 nos resíduos S15 e S20 e a fosforilação de Chk2 no resíduo T68, ocorrem em resposta a oxidação. MARTIN et al. (2009) mostrou que a

ação de ATM ocorre cerca de 1 hora após o processo de dano de DNA-apoptose. Ainda, ATM e ATR são responsáveis por fosforilar mais de 700 proteínas em resposta a dano de DNA (MATSUOKA et al. 2007), inclusive a histona H2AX. ATM também é ativado pela ligação do complexo Mre11/Rad50/Nbs1 às quebras de DNA ou ROS, e é responsável pelo recrutamento dos componentes do mecanismo de reparo de quebra de dupla fita (CLEAVER 2011). A deficiência do gene ATM foi associada com um fenótipo neurodegenerativo comprovado em modelos animais (EILAM et al. 1998; 2003) e em um grupo de pacientes com ataxia telangectasia, onde esse gene é perdido (YANG e HERRUP 2005). Supressão da função do produto da ATM atenua tanto a reentrada no ciclo celular quanto a apoptose, disparados por danos no DNA.

Alguns estudos foram realizados correlacionando os níveis do gene TP53 e da sua proteína p53 com a presença da DA. O TP53 é um gene supressor tumoral que tem como principais atuações a parada do ciclo celular ou a apoptose (Figura 4). Normalmente o produto do TP53 é mantido em baixos níveis pelo produto gênico do MDM2 (*Murine double minute-2*) ou o homólogo humano HDM2 (*Human double minute-2*), que inibem a atividade transcricional do TP53 e promovem sua degradação via proteossomo. Alguns estudos vêm demonstrando que há um aumento da imunoreatividade da proteína p53 em tecido nervoso de pacientes com DA, que pode estar relacionada a danos no DNA, uma vez que esta proteína pode ativar genes reguladores de crescimento como P21WAF/Cip1, GADD45 e ciclina G que resultam na parada do ciclo celular em G1, provavelmente para permitir o reparo do dano no DNA. Além disso, pode promover a apoptose como, por exemplo, em células gliais, que são incapazes de reparar os danos no DNA (KITAMURA et al. 1997).



Fonte: Kegg pathway – Kyoto Encyclopedia of genes and genomes.

Figura 4 - Representação da via de sinalização do TP53.

O produto do gene PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) foi identificado como um supressor de tumor que se encontrava mutado em alta frequência num grande número de cânceres esporádicos, como glioblastomas, câncer de próstata e mama (LI et al. 1997; STECK et al. 1997). O produto do gene PTEN funciona tanto como lipídio fosfatase, quanto como tirosina fosfatase (LI et al. 1997; CHIA et al. 2010). Como lipídio fosfatase PTEN regula os níveis intracelulares de fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PIP₃) por desfosforilação, gerando fosfatidilinositol 3,4 bifosfato (PIP₂). PIP₃ é um mediador de sobrevivência celular que, em altos níveis, resulta no bloqueio da progressão do ciclo celular em G1, e regula negativamente o proto-oncogene PKB/AKT. Por outro lado, quando AKT está totalmente ativo, a enzima se desloca para o citosol e núcleo (ANDJELKOVIC et al. 1997). Esse gene foi relacionado à doença de Alzheimer em alguns trabalhos que

demonstraram a desregulação de AKT no cérebro de pacientes, relacionando o aumento da imunoreatividade do resíduo Thr³⁰⁸AKT ativo em algumas regiões do cérebro, incluindo o hipocampo, com acúmulo de mudanças neurofibrilares “fase Braak”, alteração patológica específica de DA (PEI et al. 2003).

Outro importante fator é que o acúmulo de PKB/AKT ativo promove a sobrevivência celular, impedindo que as células com mudanças neurofibrilares entrem em apoptose.

Especificamente, dentre os alvos de AKT envolvidos em apoptose, inclui-se a glicogênio sintase cinase-3 β (GSK-3 β), Bad (membro próapoptótico da família BCL-2), NF κ B e Proteína elemento de ligação de resposta a cAMP (CREB) (YUAN e YANKNER 2000). Destes, o GSK-3 β está fortemente implicado na hiperfosforilação de Tau, e neurofibropatologia da DA (PEI et al. 1997, 1999), enquanto a desregulação da função de CREB leva à neurodegeneração no hipocampo e no estriato dorsolateral (MANTAMADIOTIS et al. 2002). Além disso, na última década, muitos autores demonstraram que mudanças nos níveis de PTEN estão ligadas à DA (KERR et al. 2006; RICKLE et al. 2006; SONODA et al. 2010). KERR et al. (2006) demonstraram que a presença de PTEN diminui a fosforilação de Tau indiretamente, por mecanismos que requerem a atividade lipídio-fosfatase, ou ainda independente de GSK-3 β mas possivelmente pela inibição de AKT e ERK1/2. FRASER et al. (2008) demonstrou que a deficiência de PTEN no cérebro causa defeitos na estrutura sináptica, transmissão e plasticidade, e anormalidades na mielinização.

O produto do gene PARP1 é uma proteína nuclear de 113kDa e está envolvida em diversos processos celulares e moleculares como detecção de danos de DNA, regulação da transcrição, modificação da cromatina e regulação da maquinaria

mitótica, assim como envolvido em funções patológicas (CHAITANYA et al. 2010; STROSZNAJDER et al. 2012). O aumento de proteínas da família PARP tem sido demonstrada há mais de 10 anos no cérebro e em células periféricas de pacientes com DA (LOVE et al. 1999; CECCHI et al. 2002). Outros autores demonstraram evidências que indicam que a proteína poly-ADP-ribose polimerase-I (PARP-1) desempenha um papel de mediação da morte celular em indivíduos com DA (WANG et al. 2004). PARP-1 é uma proteína “*zinc-finger*” de ligação ao DNA que é ativada por quebras de DNA fita simples ou fita dupla. A função primária de PARP-1 no processo de reparo do DNA é a detecção do dano e a prevenção de troca entre as cromátides. PARP1 ribosila algumas das proteínas, incluindo histonas, relacionadas ao reparo de DNA (COPPEDÈ e MIGLIORE 2009). Entretanto, PARP-1 também está envolvida no processo de morte celular, uma vez que células com uma grande quantidade de danos no DNA têm uma ampla ativação de PARP-1 com a subsequente diminuição de seu substrato NAD⁺, por consequência ATP, levando a insuficiência energética (KAUPPINEN et al. 2007). O próximo e irreversível evento deste programa de morte celular é a translocação, da mitocôndria para o núcleo, do fator indutor de apoptose (*apoptosis-inducing factor* - AIF) e subsequente degradação de DNA. Essa via de morte celular mediada por PARP-1 e AIF não produz corpos apoptóticos e não é mediada pela ativação de caspases (YU et al. 2002). Entretanto, essa é uma forma de morte celular programada. A mediação de PARP-1 e morte celular em células nervosas foi demonstrada em um recente estudo que demonstrou em modelos animais que a morte induzida por β -oligômeros é mediada por PARP-1 em resposta ao estresse oxidativo (ABETI et al. 2011).

A teoria do ciclo celular na DA foi proposta há mais de 15 anos (ARENDRT et al. 1996; VINCENT et al. 1996) e tem sido intensamente revisada (NAGY 2000; RAINA et al. 2004; COPANI et al. 2007, 2008; YANG e HERRUP 2007; HERRUP e YANG 2008; FRANK e TSAI 2009; BONDA et al. 2010; HERNÁNDEZ-ORTEGA et al. 2011; YUROV et al. 2011).

Em eucariontes, o ciclo celular é definido como uma série de eventos que envolvem o crescimento celular, replicação, segregação de cromossomos e criação de duas novas células a partir de uma. Este processo envolve quatro fases: G1 (crescimento), S (replicação de DNA), G2 (aumento do volume celular) e M (divisão em duas novas células filhas). Todo o processo é controlado pelas Cinases ciclinas-dependentes (*Ciclin-dependent kinases – Cdk*s), que têm papel central no controle da progressão do ciclo celular, e a ativação requer a ligação a um grupo de proteínas adjuvantes, as ciclinas, que têm o nível de expressão variável ao longo do ciclo (CURRAIS et al. 2009). Em cada estágio celular, um conjunto de ciclinas são expressas, enquanto outras são inibidas. Esse controle é realizado por regulação transcricional e proteólise (UDVARDY 1996), sendo esta última dependente da via ubiquitina-proteossoma (MOH et al. 2011).

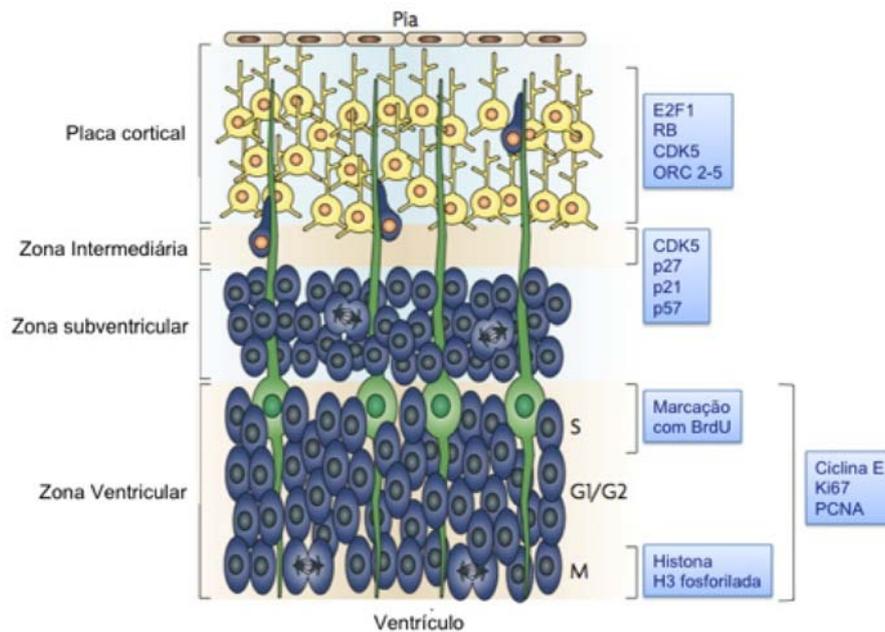
Resumidamente, durante a fase G1, sinais mitogênicos, como fatores de crescimento extracelulares ou contato intercelular, disparam a ativação do complexo CDK4/6 - ciclina D1, que fosforilam a proteína retinoblastoma (RB), ativando o fator de transcrição E2F-1, que promove a transcrição de genes necessários à progressão do ciclo celular, incluindo a ciclina E. Ao fim de G1, a atividade do complexo CDK2-ciclina E completa a transição G1/S, completando a fosforilação de Rb, levando à inativação completa, e provocando uma onda de atividade transcricional

essencial para a fase de replicação de DNA. Durante a fase S, o complexo CDK2-ciclina A fosforila vários substratos, permitindo a replicação do DNA. Ao final da fase S, a replicação de DNA cessa e as células entram na fase G2 do ciclo. CDK1 substitui CDK2, formando o complexo CDK1-ciclina A e regula a fosforilação de proteínas específicas da fase G2 e M, juntamente com o complexo CDK1-ciclina B, que aparece no final de G2 e dispara a transição de G2 para a fase M. Ciclina A é degradada e o sistema é reiniciado, restabelecendo os sinais mitogênicos induzidos pela ciclina D para o próximo ciclo (CURRAIS et al. 2009; BEUKELAERS et al. 2011).

O ciclo de vida dos neurônios se diferencia das demais células de eucariontes. Durante o desenvolvimento, a neurogênese – produção de neurônios diferenciados e funcionais - realiza-se na – Zona Ventricular (ZV), e também numa região adjacente – Zona Subventricular (ZSV) (CURRAIS et al. 2009). Ainda não se conhece bem as diferenças funcionais entre as duas regiões, uma vez que ambas geram tanto neurônios como células da glia, entretanto, apresentam diferenças celulares e moleculares. Sabe-se que a ZV é altamente estratificada e que as fases do ciclo ocorrem em diferentes níveis. As linhagens neuronais passam, aparentemente, por sucessivas divisões celulares, cerca de onze, até cessar a produção de células precursoras neuronais (NSC - *neural stem cells*). Na ZSV também ocorre divisões celulares, mas aparentemente não ocorre estratificação. Nas camadas superiores, a proliferação cessa e, então, é iniciado o processo de maturação. O córtex maduro é originado por sucessivas ondas de migração (Figura 5). No cérebro de adultos, apenas duas regiões mantêm a capacidade de neurogênese: a zona subgranular (ZSG) do giro denteado hipocampal e a zona subventricular anterior (ZSV). Por isso, o

conceito de divisão celular em neurônios nas demais regiões cerebrais é resumido como: uma vez que o neurônio deixa a ZV (ou ZSV) não volta ao ciclo celular, entrando em estágio pós-mitótico permanente – G0 (quiescência) (HERRUP e YANG 2007; CURRAIS et al. 2009). Apesar de não ocorrer ciclo celular em neurônios maduros, as proteínas de ciclo celular não são completamente silenciadas, e os neurônios apresentam uma expressão constitutiva de ciclinas, CDKs e de seus inibidores (*Cyclin-dependent kinase inhibitors* - CDKIs), mesmo no córtex de indivíduos saudáveis adultos. A expressão constitutiva destas proteínas pode estar ligada a uma função não-canônica, ou seja, não estar relacionada diretamente a funções no ciclo celular, mas potencialmente realizando funções na plasticidade e estabilidade neuronal (SCHMETSDORF et al. 2007).

Sabe-se que neurônios de pacientes com DA apresentam sinais mitogênicos que induzem a reentrada no ciclo celular (RAINA et al. 2001a e b; 2004); entram na fase S e replicam seu DNA (YANG et al. 2001; HERRUP et al. 2004; MOH et al. 2011); formam cromossomos falso-tetraplóides (YANG et al. 2001; MOSCH et al. 2007; ARENDT et al. 2010); não completam a mitose (fase M); apresentam outras aneuploidias que podem estar relacionadas com o processo patogênico (MOSCH et al. 2007; IOUROV et al. 2009, 2011; ARENDT et al. 2010); e, que a morte neuronal e consequente neurodegeneração são consequência dos eventos do ciclo celular (YANG et al. 2003, 2006; ZHU et al. 2004, 2007; HERRUP e YANG 2007; ARENDT et al. 2010; HERRUP 2010; MOH et al. 2011; YUROV et al. 2011). Todos esses eventos podem ocorrer em maior frequência nos estágios iniciais da doença em indivíduos com comprometimento cognitivo leve (*Mild cognitive Impairment*– MCI) (YANG et al. 2003).



Fonte: Adaptado de HERRUP e YANG (2007).

Figura 5 - Representação esquemática do desenvolvimento do córtex cerebral. À esquerda estão as zonas morfológicas. Células neuroepiteliais em divisão estão mostradas em azul, glia em verde e neurônios maduros em amarelo. À direita, expressão de proteínas do ciclo celular, evidenciando a estratificação da ZV.

O processo de morte celular não está bem compreendido, mas sabe-se que menos de 1/10000 neurônios exibem sinais de apoptose, e que a morte de neurônios saudáveis difere da morte de neurônios que reentram no ciclo celular. Em pacientes com DA, os neurônios não ativam um conjunto de caspases requisitados no início da apoptose, porém, possuem uma superexpressão das caspases 8 e 9, responsáveis pelas etapas finais do processo (RAINA et al. 2001a). Isso pode sugerir que os neurônios DA interrompem a propagação eficaz do processo de apoptose, resultando num processo que foi denominado de “abortose”. A abortose consiste num processo de apoptose abortiva e sobrevivência neuronal (RAINA et al. 2000, 2001a). Em HAMPTON et al. (1998), demonstraram que estresse oxidativo crônico inibe os primeiros sinais de apoptose mediados por caspases. Dessa forma, em neurônios de

DA, o estresse oxidativo induz a abortose, o que poderia explicar a sobrevivência neuronal na DA (MOH et al. 2011).

Até 2004, nenhuma das hipóteses propostas, analisando as características da DA de forma independente, foi capaz de explicar a diversidade bioquímica e as anormalidades patológicas da DA, que envolvem uma diversidade de modificações celulares e moleculares. Os modelos de uma única injúria não refletem com precisão a patogênese da DA, o que levou à proposta da hipótese dos “dois *hits*” (“*Two-hit hypothesis*”), que sugere que, assim como o câncer, a DA pode ser resultado de várias injúrias (ZHU et al. 2004, 2007). Nessa hipótese, foi proposto que tanto o estresse oxidativo, quanto anormalidades no ciclo celular podem, independentemente, iniciar, mas ambos são necessários para a propagação da patogênese e progressão da DA. A reentrada em G1 de neurônios DA pós-mitóticos causada pela expressão ectópica de proteínas do ciclo celular pode ser um mecanismo fisiológico necessário para o reparo de DNA em neurônios com danos oxidativos (KRANTIC et al. 2005).

Para tal, é importante observar duas premissas principais nessa hipótese:

- i) a presença de um estado de equilíbrio/estacionário: após o processo ter sido iniciado por um dos dois *hits*, os neurônios recrutam mudanças adaptativas permanentes e entram num estado de equilíbrio compensatório que pode durar décadas, em que os neurônios ainda desempenhariam suas funções normalmente ou, na pior das hipóteses, com pequeno comprometimento da função neuronal;
- ii) o esgotamento do potencial compensatório neuronal: o novo estado estável requer grandes adaptações compensatórias que, provavelmente, depletam

muito o potencial neuronal compensatório por combater a injúria. Portanto, os neurônios no estado novo estacionário ficam particularmente vulneráveis à segunda injúria que requer mudanças compensatórias adicionais em outras vias (ZHU et al. 2007).

Alguns estudos demonstraram potenciais propriedades compensatórias do peptídeo A β (SMITH et al. 2002; HAYASHI et al. 2007; NAKAMURA et al. 2007; MOREIRA et al. 2008) e das NFT (MORSCH et al. 1999). Em resposta a danos oxidativos, é provável que as secretases α e γ induzam a produção de A β , com a finalidade de neutralizar os radicais livres (TAMAGNO et al. 2002, 2005; KIM e SHEN 2008). Entretanto, na presença de grandes agregados, como na DA avançada, tais propriedades antioxidantes não seriam eficazes, o que levaria à disfunção e morte neuronal (ZHU et al. 2004, 2007).

Entendendo que estresse oxidativo, danos de DNA, reentrada no ciclo celular e morte celular são mecanismos importantes na DA e que a relação entre os mesmos pode estabelecer parâmetros da progressão da doença, este estudo objetiva avaliar marcadores de dano de biomoléculas e supressores de tumor em 3 áreas cerebrais acometidas em diferentes fases da doença, para estudar possíveis relações entre estes fatores e alterações anatomopatológicas assim como a presença de sintomas clínicos. É importante ressaltar que, nosso grupo, marcadores de ciclo celular, assim como de morte celular, também estão sendo estudados nos mesmos casos e controles.

2 OBJETIVOS

- 1 Estudar se existe uma associação entre a presença de estresse oxidativo, através da análise de danos a biomoléculas, e atividade de genes supressores de tumor relacionados a danos em biomoléculas, em tecido *post-mortem* de indivíduos com a doença de Alzheimer e indivíduos idosos normais.

- 2 Estudar se existe uma associação entre a presença de estresse oxidativo, através da análise de danos a biomoléculas, e atividade de genes supressores de tumor relacionados a danos em biomoléculas, em tecido *post-mortem* de grupos de indivíduos idosos com os achados patológicos da DA, diferenciados pela presença ou ausência da clínica.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

As amostras e todas as informações clínicas foram concedidas pelo Banco de Encéfalos Humanos do Grupo de Estudos de Envelhecimento Cerebral (BEHGEEC) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (GRINBERG et al. 2007).

3.1.1 Avaliação Neuropatológica

Para a avaliação neuropatológica foi utilizada a técnica de imunohistoquímica, conforme critérios aceitos internacionalmente (GRINBERG et al. 2007). Os emaranhados neurofibrilares e as placas neuríticas foram avaliados por neuropatologistas de acordo com o estadiamento de Braak e o CERAD (Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease), respectivamente.

A classificação de Braak é baseada na distribuição dos emaranhados neurofibrilares, e agrupa as alterações em 6 estágios: estágios entorhinais (I / II), estágios límbicos (III / IV) e estágios neocorticais (V / VI) (BRAAK e BRAAK 1991).

O CERAD descrito por MIRRA et al. (1991) utiliza a semiquantificação de placas neuríticas (PN), onde são considerados 4 níveis: 0: nenhuma placa, A: esparsas, B: moderadas, e C: frequentes.

Para a classificação, casos com estágio de Braak ≥ 4 , juntamente com a presença de placas neuríticas moderadas ou frequentes em uma ou mais regiões corticais (CERAD = B ou C), foram considerados positivos para a patologia da DA.

3.1.2 Avaliação Clínica

Foi utilizado o Escore Clínico de Demência (Clinical Dementia Ratio - CDR) (MORRIS et al. 1991). Esta escala têm se tornado “padrão ouro” para a avaliação global de pacientes portadores de DA, mas também está indicada para a avaliação de outros tipos de demência. Avalia seis domínios: memória, orientação, julgamento e resolução de problemas, assuntos comunitários, casa e hobbies, e autocuidado. Desse modo, essa escala cobre a intersecção entre a funcionalidade e os aspectos cognitivos. A escala é dividida em cinco níveis: CDR 0 – status cognitivo normal; CDR 0,5 – status cognitivo questionável, também considerado como comprometimento cognitivo leve; CDR 1 – demência leve; CDR 2 – demência moderada; CDR 3 – demência avançada. (MORRIS et al. 1991; ISELLA et al. 2006)

3.2 RECEPÇÃO E SELEÇÃO DE CASOS – BANCO DE ENCÉFALOS DA FMUSP

O BEHGEEC foi criado em 2004 para atender à demanda por amostras do envelhecimento cerebral. Todo material é captado no Serviço de Verificação de Óbitos da Capital (SVOC), localizado no subsolo da FMUSP, sendo o material processado e armazenado no Laboratório de Fisiopatologia do Envelhecimento, coordenado pelo Prof. Dr. Wilson Jacob Filho.

O SVOC concentra todas as autópsias das mortes naturais, por causa mal definida da cidade de SP. A cada ano são realizadas por volta de 13000, 60% delas em pessoas com mais de 50 anos de idade. Os critérios de seleção dos casos foram:

A) Critério de inclusão

Pessoas com idade acima de 50 anos na data da morte.

B) Critérios de exclusão

- 1- Indivíduos que morreram por causas cerebrais primárias: acidente vascular encefálico de origem isquêmica ou hemorrágica, traumatismo craniano, meningite, tumores etc;
- 2- Pacientes que passaram por situações com o potencial de causar lesões cerebrais isquêmicas secundárias como, por exemplo, encefalopatia anóxica de longa duração;
- 3- Pacientes portadores de comorbidades que possam, potencialmente, prejudicar a função cognitiva no período de seis meses anteriores ao óbito, como aqueles portadores de doenças crônicas em fase avançada, ou depressão, retardo mental e outros transtornos psiquiátricos;
- 4- Inexistência do cuidador primário ou familiar responsável para fornecer informações adequadas relacionadas à história pregressa, antecedentes pessoais e funcionalidade do indivíduo;
- 5- Pacientes com uso crônico de benzodiazepínicos (mais que 6 meses).

Na chegada do cadáver ao SVOC, caso o sujeito atenda os critérios de seleção, é explicado ao responsável pelo cadáver sobre a natureza do projeto e apresentado o

termo de Consentimento Livre e Esclarecido. No caso de aceite, o cuidador é identificado para que se possa alcançar confiabilidade das informações transmitidas. É dada preferência pelo cuidador primário. No caso de indivíduos que não tinham cuidador primário, a escolha do cuidador é feita a partir da identificação do familiar que tenha maior vínculo com o paciente (contato de, no mínimo, uma vez por semana).

Todo esse procedimento é realizado por uma equipe treinada e coordenada por uma gerontóloga (Dra. Renata Ferreti). Como os cadáveres só são submetidos à autópsia quando reclamados pelos responsáveis e como se espera algumas horas até a liberação do corpo, as entrevistas não atrasam os procedimentos funerários.

3.3 COLETA E ARMAZENAMENTO

No momento da autópsia, realizada entre 4 a 16 horas após o óbito, o médico responsável separa os encéfalos dos casos selecionados. Os procedimentos são divididos em três etapas: i) durante a autópsia; ii) imediatamente após a autópsia e; iii) durante a pós-fixação.

Na primeira etapa, o peso corporal, altura e tamanho do crânio são medidos. O sangue é retirado da aorta. Cérebro, coração, artérias carótidas cervicais e uma amostra de rim são removidos. Na segunda etapa, o cérebro e coração são medidos (peso e volume) e fotografados. Três amostras de 1 x 1 centímetros cada são retiradas de áreas selecionadas e congeladas em criotubos devidamente identificados. Depois, o cérebro, coração e carótidas são fixados. Todo o material é fixado em paraformaldeído 4% tamponado por 3 semanas. Na última etapa, qualquer tecido

excedente é descartado e enterrado de acordo com a legislação brasileira (GRINBERG et al. 2007).

3.4 AMOSTRAS SELECIONADAS

As amostras selecionadas para o presente estudo foram categorizadas da seguinte maneira:

- a) Doença de Alzheimer sintomática (DA) - indivíduos com DA no exame anatomopatológico (Braak = IV / V / VI e CERAD = B / C) e com comprometimento cognitivo ($CDR \geq 2$).
- b) Doença de Alzheimer assintomática (asDA) - indivíduos com DA no exame anatomopatológico (Braak = IV / V / VI e CERAD = B / C) e sem comprometimento cognitivo ($CDR = 0$).
- c) Indivíduos Normais (N) - indivíduos sem DA no exame anatomopatológico e (Braak = 0/ I / II e CERAD = 0 / A) e sem comprometimento cognitivo ($CDR = 0$).

3.4.1 Amostras em FFPE

Foram selecionados 64 indivíduos para fazer parte do estudo, sendo 20 indivíduos com DA Sintomática; 13 indivíduos com DA Assintomática; e 31 indivíduos de envelhecimento normal (Quadro 1). De cada indivíduo, foram selecionados blocos de parafina de três regiões cerebrais – hipocampo (H), córtex entorrinal (E) e córtex temporal (T).

Quadro 1 - Características das amostras de FFPE selecionadas.

GRUPO	ID	GEN	CDR	braak	CERAD	GRUPO	ID	GEN	CDR	braak	CERAD	GRUPO	ID	GEN	CDR	braak	CERAD
TMA_DAs01	87	F	3	5	B	TMA_DAs01	86	F	0	6	C	TMA_N01	90	M	0	2	0
TMA_DAs02	83	F	3	6	C	TMA_DAs02	81	F	0	5	C	TMA_N02	92	M	0	3	A
TMA_DAs03	86	M	3	6	B	TMA_DAs03	82	M	0	4	B	TMA_N03	82	F	0	2	A
TMA_DAs04	82	F	2	5	C	TMA_DAs04	83	F	0	3	B	TMA_N04	83	M	0	2	0
TMA_DAs05	81	F	2	5	B	TMA_DAs05	89	F	0	4	C	TMA_N05	80	M	0	2	0
TMA_DAs06	81	F	2	5	C	TMA_DAs06	80	M	0	4	B	TMA_N06	82	F	0	3	0
TMA_DAs07	92	M	3	6	C	TMA_DAs07	91	M	0	4	B	TMA_N07	81	F	0	3	A
TMA_DAs08	83	F	3	6	C	TMA_DAs08	82	M	0	4	B	TMA_N08	86	M	0	1	A
TMA_DAs09	90	F	3	4	B	TMA_DAs09	87	F	0	5	C	TMA_N09	80	F	0	2	0
TMA_DAs10	82	F	3	5	C	TMA_DAs10	85	F	0	5	C	TMA_N10	95	M	0	3	0
TMA_DAs11	99	F	3	5	B	TMA_DAs11	80	M	0	4	B	TMA_N11	94	F	0	2	0
TMA_DAs12	81	F	3	6	C	TMA_DAs12	97	F	0	3	C	TMA_N12	83	M	0	1	0
TMA_DAs13	94	F	3	4	B	TMA_DAs13	98	F	0	3	B	TMA_N13	83	F	0	2	0
TMA_DAs14	84	M	3	5	C							TMA_N14	83	M	0	0	0
TMA_DAs15	82	F	2	5	C							TMA_N15	83	F	0	2	A
TMA_DAs16	82	F	3	6	C							TMA_N16	81	F	0	1	0
TMA_DAs17	81	F	3	5	C							TMA_N17	93	F	0	2	0
TMA_DAs18	82	F	3	6	C							TMA_N18	82	F	0	2	0
TMA_DAs19	87	F	2	6	B							TMA_N19	82	M	0	2	0
TMA_DAs20	92	F	3	6	B							TMA_N20	82	F	0	2	0
												TMA_N21	82	F	0	1	0
												TMA_N22	82	M	0	2	0
												TMA_N23	86	F	0	2	0
												TMA_N24	86	F	0	2	0
												TMA_N25	89	M	0	2	0
												TMA_N26	82	F	0	3	0
												TMA_N27	80	M	0	3	0
												TMA_N28	83	F	0	1	A
												TMA_N29	89	M	0	2	0
												TMA_N30	81	M	0	2	0
												TMA_N31	83	M	0	1	0

3.4.2 Amostras congeladas

Dos 64 indivíduos selecionados para fazer parte do nosso grupo de estudo, obtivemos tecido hipocampal congelado de 16 indivíduos. Para aumentar essa amostragem, foram concedidos pelo BEHGEEC o tecido hipocampal congelado de mais 13 indivíduos, com o mesmo perfil das amostras de FFPE, para compor nosso grupo de estudo.

No Quadro 2, abaixo, demonstra-se as amostras congeladas do presente estudo

Quadro 2 - Características das amostras de congeladas selecionadas, demonstrando a equivalência com as amostras FFPE.

GRUPO	ID	GEN	CDR	braak	CERAD	GRUPO	ID	GEN	CDR	braak	CERAD	GRUPO	ID	GEN	CDR	braak	CERAD
Comp_DAs01/TMA_DAs01	87	F	3	5	B	Comp_DAa01	72	M	0	6	C	Comp_N01/TMA_N02	92	M	0	3	A
Comp_DAs02	93	F	3	6	C	Comp_DAa02/TMA_DAa01	86	F	0	6	C	Comp_N02	71	F	0	0	0
Comp_DAs03/TMA_DAs02	83	F	3	6	C	Comp_DAa03/TMA_DAa09	87	F	0	5	C	Comp_N03/TMA_N10	95	M	0	3	0
Comp_DAs04/TMA_DAs04	82	F	2	5	C	Comp_DAa04/TMA_DAa10	85	F	0	5	C	Comp_N04/TMA_N11	94	F	0	2	0
Comp_DAs05/TMA_DAs11	99	F	3	5	B							Comp_N05	79	M	0	1	0
Comp_DAs06/TMA_DAs14	84	M	3	5	C							Comp_N06/TMA_N16	81	F	0	1	0
Comp_DAs07	82	F	2	4	B							Comp_N07	77	M	0	1	A
Comp_DAs08	69	M	2	6	C							Comp_N08/TMA_N21	82	F	0	1	0
Comp_DAs09	86	F	1	4	C							Comp_N09	57	M	0	0	0
Comp_DAs10	77	F	3	4	A							Comp_N10	65	F	0	0	0
Comp_DAs11	83	F	3	5	A							Comp_N11	59	F	0	0	0
												Comp_N12/TMA_N25	89	M	0	2	0
												Comp_N13/TMA_N28	83	F	0	1	A
												Comp_N14/TMA_N29	89	M	0	2	0

3.5 AVALIAÇÃO DE DANOS DE BIOMOLÉCULAS

Para mensurar a quantidade de danos de biomoléculas, usamos reações de imunohistoquímica: como medida direta de dano ao DNA, o aduto 8OHdG; como medidas indiretas, a histona H2AX fosforilada (λ -H2AX); e para medida de peroxidação lipídica, o Malondialdeído – MDA.

As imunohistoquímicas foram realizadas segundo o protocolo descrito abaixo, com anticorpo monoclonal 8OHdG, clone N45.1, da JalCA, escolhido com base na literatura (TOYOKUNI et al. 1997; TANAKA et al. 1997); e os anticorpos policlonais anti-malondialdeído (MDA) ab27644, da Abcam e anti- λ -H2AX (NB100-2280), da Novus Biologicals.

3.6 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES SUPRESSORES DE TUMOR

Uma vez mensurados os danos no DNA, avaliamos a expressão dos níveis dos produtos gênicos de supressores tumorais, pela técnica de imunohistoquímica (protocolo abaixo descrito) e RT-PCR para quantificação e posterior comparação entre os grupos.

Foram analisados seis genes supressores de tumor (BRCA1, PTEN, PARP, ATM, Rb e TP53) descritos na literatura como envolvidos no reparo de DNA em pacientes com Alzheimer.

3.7 IMUNOHISTOQUÍMICA

Para as imunohistoquímicas foi construído um Tissue microarray com 3 áreas cerebrais: hipocampo (H), córtex entorrinal (E) e córtex temporal (T), de cada amostra do presente estudo.

3.7.1 Construção do Tissue microarray

Áreas do hipocampo e do córtex frontal foram selecionadas e revistas por patologistas que determinaram a melhor área do tecido para a punção com agulha de 1mm. Os cilindros obtidos foram transferidos para o bloco de parafina receptor em posição bidimensional determinada e gravada pelo equipamento. Um mapa, com identificação detalhada de cada amostra, foi construído em planilha de Excel® (Microsoft, EUA) permitindo a localização exata de cada caso (Quadro 3).

Os blocos de TMA foram cortados no micrótomo rotativo na espessura de 3 μm e colhidos em lâminas adesivas da Instrumedics (Hackensack NJ, EUA).

Quadro 3 - Mapa de localização das amostras no TMA construído para o presente estudo.

mm	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	mm
0	Piamenta	05/6721 B	05/6721F H	05/6721F E	04/4367 B	04/4367F H	04/4367F E	04/4881 B	04/4881F H	04/4881F E	05/5404F B	05/5404F H	05/5404F E	05/7760 B	05/7760F H	05/7760F E	0
1	04/5669 B	04/5669F H	04/5669F E	07/1345 B	07/1345F H	07/1345F E	07/691 B	07/691F H	07/691F E	07/648 B	07/648F H	07/648F E	05/3980 B	05/3980F H	05/3980F E	05/11393 B	1
2	05/11393F H	05/11393F E	05/7262 B	05/7262F H	05/7282F E	05/10460 B	05/10460F H	05/10460F E	05/9766 B	05/9766F H	05/9766F E	05/5221 B	05/5221F H	05/5221F E	05/5615 B	05/5615F H	2
3	05/5615F E	05/5013 B	05/5013F H	05/5013F E	05/5860 B	05/5860F H	05/5860F E	07/1281 B	07/1281F H	07/1281F E	05/10921 B	05/10921F H	05/10921F E	04/9630 B	04/9630F H	04/9630F E	3
4	04/6760 B	04/6760F H	04/6760F E	04/9376 B	04/9376F H	04/9376F E	05/6377 B	05/6377F H	05/6377F E	05/7988 B	05/7988F H	05/7988F E	05/6726 B	05/6726F H	04/5964 B	04/5964F H	4
5	04/5964F E	05/6947 B	05/6947F H	05/6947F E	04/8373 B	04/8373F H	04/8373F E	05/6910 B	05/6910F H	05/6910F E	05/6648 B	05/6648F H	05/6648F E	05/1604 B	05/1604F H	05/1604F E	5
6	05/6000 B	05/6000F H	05/6000F E	05/3966 B	05/3966F H	05/3966F E	05/3914 B	05/3914F H	05/3914F E	04/6950 B	04/6950F H	04/6950F E	05/4506 B	05/4506F H	05/4506F E	07/698 B	6
7	07/698F H	07/698F E	04/5035 B	04/5035F H	05/5035F E	07/2025 B	07/2025F H	07/2025F E	05/4980 B	05/4980F H	05/4980F E	04/10316 B	04/10316F H	04/10316F E	04/4271 B	04/4271F H	7
8	04/4271F E	05/5909 B	05/5909F H	04/6802 B	04/6802F H	04/6802F E	05/6602 B	05/6602F H	05/6602F E	3535 B	3535F H	3535F E	05/5915 B	05/5915F H	05/5915F E	05/6715 B	8
9	05/6715F H	05/6715F E	05/6803 B	05/6803F H	05/6495 B	05/6495F H	05/6495F E	07/1995 B	07/1995F H	07/1995F E	07/1995F E	04/7867 B	04/7867F H	04/7867F E	05/5422 B	05/5422F H	9
10	05/5422F E	05/10455 B	05/10455F H	04/5167 B	04/5167F H	04/5167F E	05/5042 B	05/5042F H	05/5042F E	04/10743 B	04/10743F H	04/10743F E	07/1748 B	07/1748F H	07/1748F E	05/5945 B	10
11	05/5945F H	05/5908 B	05/5908F H	05/1961 B	05/1961F H	05/1961F E	05/6411 B	04/11148 B									11
12																	12
13																	13
14																	14
15																	15
16																	16
17																	17
18																	18
mm	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	mm

3.7.2 Reações de imunohistoquímica

As reações de imunohistoquímica foram realizadas de acordo com o protocolo já padronizado no Hospital A.C. Camargo. Após 24 horas em estufa 60°C, as lâminas são desparafinadas com xilol (60°C por 20 minutos e temperatura ambiente por 20 minutos) e etanol (100, 85 e 70%, 30 segundos cada); as lâminas são lavadas e a recuperação antigênica é feita em panela de pressão com tempão citrato 10mM pH 6,0, até a fervura. Depois das lâminas serem lavadas com água, o bloqueio da peroxidase endógena é feito com peróxido de hidrogênio 3% (água oxigenada 10 volumes), com 4 trocas de 5 minutos cada; após o bloqueio as lâminas são lavadas com PBS 10mM pH 7.4 por 5 minutos e durante 20 minutos ficam incubadas à temperatura ambiente com a solução bloqueadora de proteína do kit DAKO™. As lâminas foram incubadas com o anticorpo primário diluído em PBS contendo BSA 1% e azida sódica 0,1%, por 18 horas a 4°C em câmara úmida. Para cada anticorpo foi utilizada uma diluição, e para cada reação foi utilizado um tecido sabidamente imunorreativo como controle positivo da reação (Quadro 4). As lâminas foram lavadas em PBS (3 trocas de 3 minutos a cada nova incubação). Após a incubação overnight, segue-se com Post Primary Block (NovoLink Max Polymer) (30 minutos a 37°C); seguido de NovoLink Polymer (30 minutos a 37°C); e, por fim, em solução substrato (60mg DAB, 1ml DMSO, 1ml H2O2 6% e 100ml PBS) (5 minutos a 37°C), ao abrigo da luz. Após a precipitação, as lâminas são lavadas em água corrente e contracoradas com Hematoxilina de Harris por 1 minuto, novamente lavadas e imergidas em água amoniacal (hidróxido de amônio 0.5%). Após serem lavadas, as lâminas são desidratadas em etanol 80, 95 e 100% (30 segundos cada) e xilol (4 vezes, 30 segundos cada), e montadas em Entellan neu (Merck).

Quadro 4 - Anticorpos utilizados para os danos de biomoléculas e supressores de tumor, com suas respectivas especificações.

Anticorpo	Marca	Clone	Ccontrole positivo	Diluição
8OHdG	JalCA	N45.1	Córtex renal	1:600
λ-H2AX	Novus Biologicals	Policlonal	Carcinoma de pulmão não pequenas células	1:200
ATM	Epitomics	Y170	Carcinoma de mama	1:75
BRCA1	Dako	GLK2	Carcinoma de mama	-
MDA	Cosmo Bio	Policlonal	Córtex renal	1:450
P53	Dako	DO-7	Carcinoma de mama	1:2500
PARP1	Zymed	C-2-10	Tonsila	1:200
PTEN	Cascade	6H2.1	Próstata	1:100
RB	Novocastra	13A10	Pele	1:25

As análises das imunohistoquímicas foram realizadas no Aperio ImageScopeTM v.10.2.2.2352, utilizando apenas as células de interesse. A primeira estratégia foi demarcar/circular todos os neurônios do “core”, e assim quantificar, separadamente, as marcações de núcleo e citoplasma (Figura 6). Essa estratégia dispensou muito tempo, porém os valores de intensidade que são gerados pelo programa e os resultados saem em duas planilhas independentes para a análise de núcleo e citoplasma.

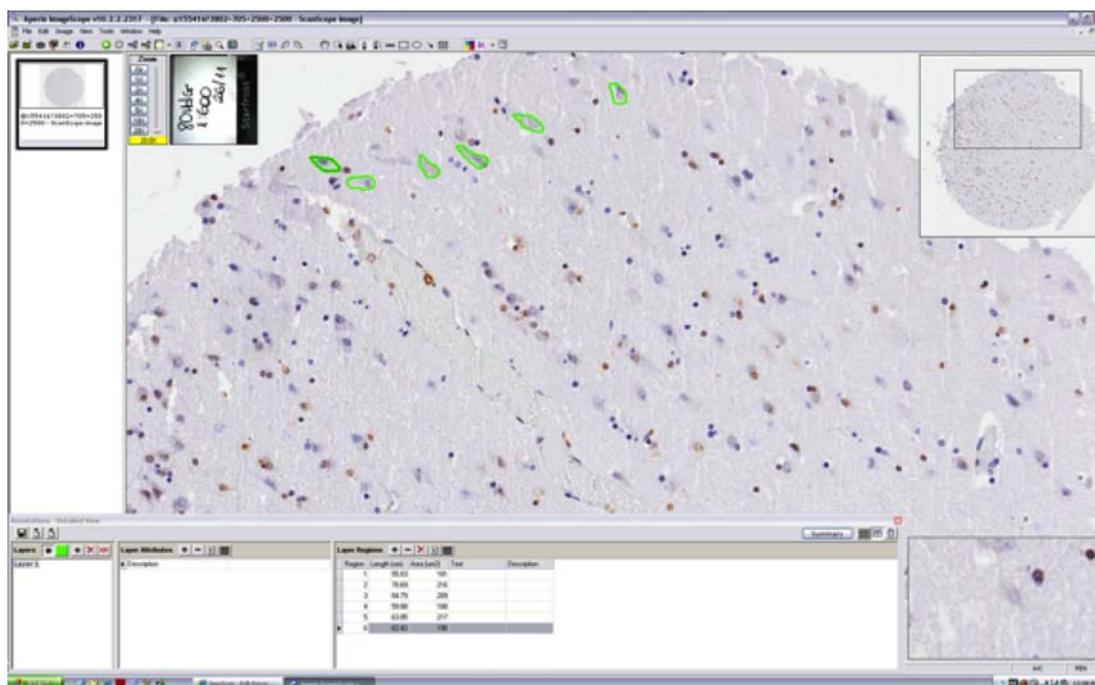


Figura 6 - Demarcações por neurônio realizadas no ImageScopeTM para a análise de marcação de núcleo e citoplasma. Em verde demonstramos as células já circundadas de uma a uma.

Estudando mais detalhadamente os algoritmos do ImageScopeTM, mais precisamente o algoritmo “IHC nuclear v1”, detectamos a presença dos parâmetros tamanho mínimo e tamanho máximo da célula. Criando um novo macro, chamado “IHC nuclear v1 Neurônio”, onde alterando o parâmetro tamanho mínimo do núcleo ($45\mu\text{m}^2$) e tamanho máximo do núcleo ($500\mu\text{m}^2$) (Figura 7a) conseguimos distinguir nossas células de interesse (Figura 7b), os neurônios, das células da glia, na análise dos marcadores nucleares, dispensando muito menos tempo que em nossa primeira estratégia de análise. Para a análise de marcadores nucleares através dos dados obtidos no Aperio, em parceria com o departamento de bioinformática e bioestatística do CIPE/A.C. Camargo, foi desenvolvido um algoritmo que considera os valores de porcentagem de células marcadas e a intensidade de marcação.

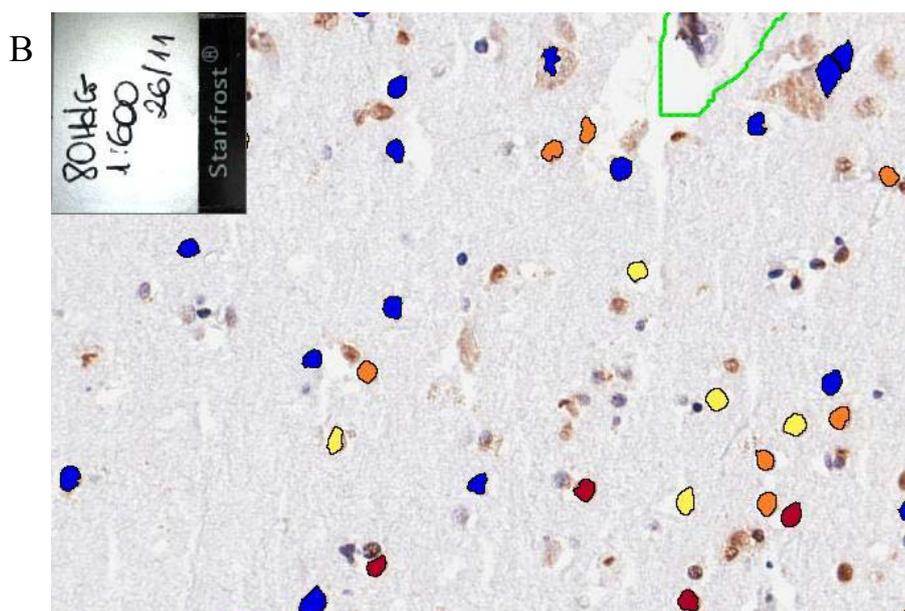
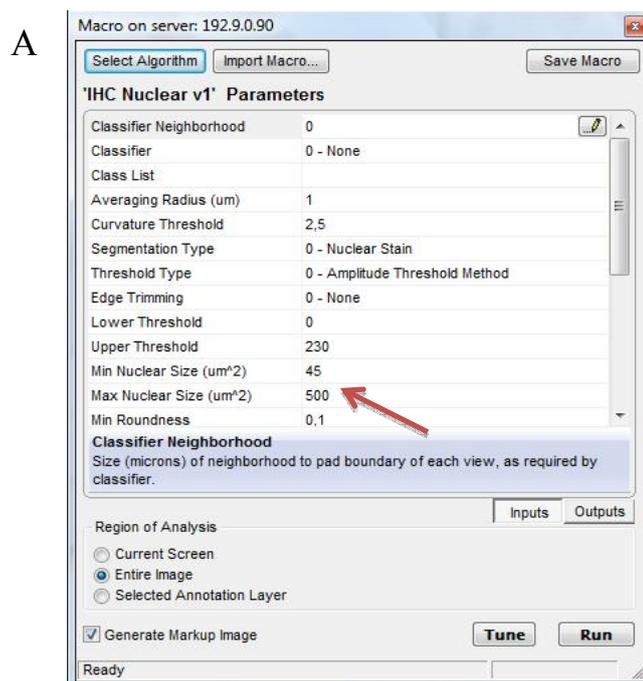


Figura 7 - (A) Parâmetros utilizados no algoritmo IHC nuclear v1, o qual está sendo utilizado para análise dos marcadores nucleares do presente trabalho. A seta vermelha indicando as modificações feitas. (B) Imagem do programa ImageScopeTM do marcador 80HdG, demonstrando a marcação exclusiva de neurônios (núcleo).

As cores são relativas às intensidades de marcação consideradas pelo programa. Em azul – ausência de imunoreatividade, negativo; em amarelo - marcação fraca; em laranja – marcação moderada; em marrom – marcação forte.

A análise do citoplasma foi realizada com o auxílio do patologista, Dr. Antônio Hugo J.F.M. Campos, na qual analisamos apenas as células de interesse, neurônios, identificadas através da imunohistoquímica com os marcadores Phospho-Tau e Beta-amilóide. O valor de intensidade (*intensity value*) de coloração foi escalonado seguindo as gradações: 0 = Sem marcação do anticorpo; 1 = marcação fraca; 2 = Marcação moderada; 3 = Marcação forte; 4 = marcação muito forte. A semi-quantificação de células positivas (*percent*) para o anticorpo foi escalonada: 0 = nenhum neurônio positivo; 1 = 25% de neurônios positivos; 2 = 25–50% de neurônios positivos; 3 = 50–75% de neurônios positivos; 4 = >75% de neurônios positivos (SOINI et al. 2001; CAMPOS et al. 2009). Para o escore final foi utilizado o mesmo algoritmo desenvolvido para as análises da marcação nuclear.

3.7.3 Análise Estatística

Para a análise estatística dos dados provenientes do Aperio e observação do patologista, utilizamos um método desenvolvido em conjunto com o Dr. Carlos Pereira (IME-USP) e Aline Damascena do departamento de Bioinformática e Bioestatística – CIPE A.C. Camargo. Esse método utiliza os valores da intensidade de marcação (*intensity value*) e a porcentagem de células marcadas (*percent*) para criar um escore de expressão. Como marcação fraca pode ter um significado biológico questionável, dessa forma, criamos dois grupos para os valores do percentual de células marcadas, usando como corte o percentil 25 ($P_{0,25}$) onde: 1 ($>P_{0,25}$); e 0 ($<P_{0,25}$).

A equação criada foi:

$$\text{Escore final} = \% \text{ score} + (n\text{Class} \times \text{intensity})$$

Onde:

$\% \text{ score} = \text{score} (0,1)$ obtido do percentil 25 ($P_{0,25}$) dos valores de percent

(porcentual de células marcadas)

$n\text{Class} = \text{número de classes de intensity value}$

$\text{intensity} = \text{Valor de intensidade de marcação}$

Dessa forma, excluímos a possibilidade de atribuir o mesmo escore para cores pouco marcados, porém de marcação intensa, e cores com marcação extensa, de menor intensidade. Sendo assim, criamos uma matriz, como exemplificado no Quadro 5:

Quadro 5 - Exemplo de matriz para obtenção dos escores finais, obtidos a partir dos dados de saída do Aperio (marcadores nucleares) e observações do patologista (marcadores citoplasmáticos), onde $n\text{Class} = 3$.

Escore final		$3x \text{ intensity}$		
		1	2	3
% Score	0	3	6	9
	1	4	7	10

Todas as análises foram realizadas separando as 3 áreas amostradas (hipocampo, córtex entorrinal e córtex temporal). Para todas as áreas analisamos as diferenças entre os 3 grupos (Doença de Alzheimer sintomática x Doença de Alzheimer assintomática x Envelhecimento normal); em seguida entre presença ou ausência de patologia (Doença de Alzheimer sintomática + Doença de Alzheimer

assintomática x Envelhecimento normal); e presença ou ausência de sintomas clínicos (Doença de Alzheimer sintomática x Doença de Alzheimer assintomática).

Para comparação dos escores entre os grupos Normal, asDA e DA, utilizamos o FBST (Full Bayesian Significance Test), um teste bayesiano que assume que a hipótese H é determinada como um subconjunto definido pelas restrições de igualdade e desigualdade (PEREIRA et al. 2006, 2008). Neste teste, a medida de significância é dada pelo evidence value (e-value). Para nosso estudo foi calculado o p-value, a partir da medida de evidencia, através de uma aproximação assintótica, uma vez que, para amostras grandes de uma população sobre a hipótese, a medida de evidência (e-value) segue uma distribuição de qui-quadrado (PEREIRA et al. 2008; LAURETTO et al. 2009; DINIZ et al. 2012).

A análise discriminante linear foi utilizada para identificar qual função dos escores de cada marcador separa os pacientes com patologia da DA dos indivíduos com envelhecimento normal. Para melhor interpretação dos resultados, separamos os dados por localização, fazendo a análise para hipocampo e córtices. Para cada tecido foram calculadas todas as funções discriminantes possíveis e a melhor função identificada foi a que apresentou os maiores valores de especificidade e sensibilidade.

Ainda, com a finalidade de comparar os grupos em relação aos marcadores de dano e reparo de biomoléculas, utilizamos a distribuição beta. Nosso objetivo é comparar grupos, com respeito às respectivas proporções de indivíduos, satisfazendo uma determinada característica. Para essa comparação utilizamos as respectivas funções de verossimilhança. Ao normalizarmos essas funções por suas áreas totais, estas são transformadas em funções de densidades de probabilidades. Estas funções

se tornam as densidades a posteriori de cada grupo, considerando que as densidades a priori são não informativas; distribuições uniformes para as proporções em estudo. Como os modelos estatísticos naturais são distribuições binomiais, com as respectivas probabilidades sendo as proporções que desejamos estimar – desconhecidas e de interesse –, as posteriores obtidas são funções de densidade Beta com parâmetro $(x+1; y+1)$. Lembremos que x é o número de observações com a característica estudada e y o número de observações que não possuem a característica. Por outro lado, estamos tratando de amostras independentes. Se p_1 é a chance (desconhecida) de um indivíduo do grupo 1 ter a característica em estudo e p_2 a chance (desconhecida) de um indivíduo do grupo 2 ter a característica, podemos simplesmente usar nossas densidades a posteriori para calcular a probabilidade de $p_1 > p_2$. Para isso, os escores foram agrupados nas categorias: i) marcação forte (escores com maior distribuição e maior intensidade de marcação); e ii) marcação fraca (escores com menor distribuição e menor intensidade de marcação). Para esta análise utilizamos como nível de significância o percentil 60.

3.8 PCR EM TEMPO REAL – RT-QPCR

Para a quantificação dos supressores de tumor foi realizada a técnica de PCR em tempo real (RT-qPCR).

3.8.1 Extração de RNA

O RNA das amostras foi extraído no Laboratório de extração de macromoléculas, sob supervisão das MSc. Eloísa Olivieri e Vera Prescinoti, com o RNeasy Mini Kit (QiagenTM).

Este kit foi desenvolvido para isolar RNA de pequenas quantidades de material. É um método simples e rápido que combina propriedades de ligação seletiva de uma membrana de sílica-gel com a velocidade das microcentrífugas.

A amostra foi cortada em pedaços menores (30mg) utilizando um bisturi. Nos tubos com beads magnéticos do kit do Precellys® foi previamente adicionado 600µl do RLT buffer. O tecido congelado foi cortado em pedaços ainda menores, sem haver o descongelamento da amostra. Trinta miligramas do tecido foram colocados nos tubos do kit Precellys® previamente preparados. Os tubos foram colocados no Precellys® e homogeneizados por 10 segundos na velocidade máxima (6.500rpm) e imediatamente colocados no gelo até a próxima etapa. A solução aquosa foi transferida para um novo tubo eppendorf de 1,5ml e centrifugada à velocidade máxima por 3 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionado à mesma quantidade (v/v) de etanol 80% e homogeneizado com o auxílio da pipeta. A solução foi centrifugada por 3 minutos à velocidade máxima. Do volume total do sobrenadante, foi retirado 700µL e colocado na coluna RNeasy spin column inserida em um tubo de coleta de 2ml fornecido pelo kit e centrifugado por 15 segundos a 10.000 rpm. O fluido contido no tubo de coleta foi descartado. O restante da solução sobrenadante foi transferida na mesma coluna RNeasy spin column da respectiva amostra e repetido o passo anterior. Posteriormente, foi adicionado 700µl do RW1 buffer na coluna RNeasy spin column e centrifugado por

15 segundos à 10.000 rpm para lavar a membrana da coluna, descartando posteriormente o tudo de coleta. Adicionamos 500µl do Buffer RPE com ETOH 100%, previamente preparado, segundo as indicações do fabricante e centrifugamos por 15 segundos à 10.000 rpm para lavar a membrana da coluna. O fluido contido no tubo de coleta foi descartado. Adicionamos 500µl do ETOH 80% na coluna e centrifugamos por 2 minutos à 10.000 rpm para lavar a membrana da coluna e, posteriormente, descartando o fluido contido no tubo de coleta. Foi feita uma centrifugação por 1 minuto à velocidade máxima (13.200 rpm) para remover o excesso de etanol da coluna. A coluna RNeasy spin column foi colocada em um tubo de 1,5ml e adicionado 30µl de RNase-free water no meio da membrana da coluna. Os tubos foram incubados à temperatura ambiente e por 1 minuto a 42°C na estufa. Como etapa final, centrifugamos por 1 minuto à velocidade máxima (13.200 rpm) para eluir o RNA. Para garantir que todo RNA saia da coluna, passamos o mesmo eluato do passo anterior novamente pela coluna e centrifugamos por 1 minuto à velocidade máxima (13.200 rpm).

3.8.2 Quantificação do RNA total

A quantificação do RNA total foi realizada através de espectrofotometria na região do ultravioleta através da leitura da absorbância nos comprimentos de onda de 260 e 280 nanômetros utilizando espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000). O grau de pureza do RNA foi avaliado com base na razão entre as leituras de 260 e 280nm, uma vez que valores superiores a 1,8 para essa relação sugerem que o RNA está essencialmente puro e passível de ser usado na maioria dos procedimentos de manipulação genética.

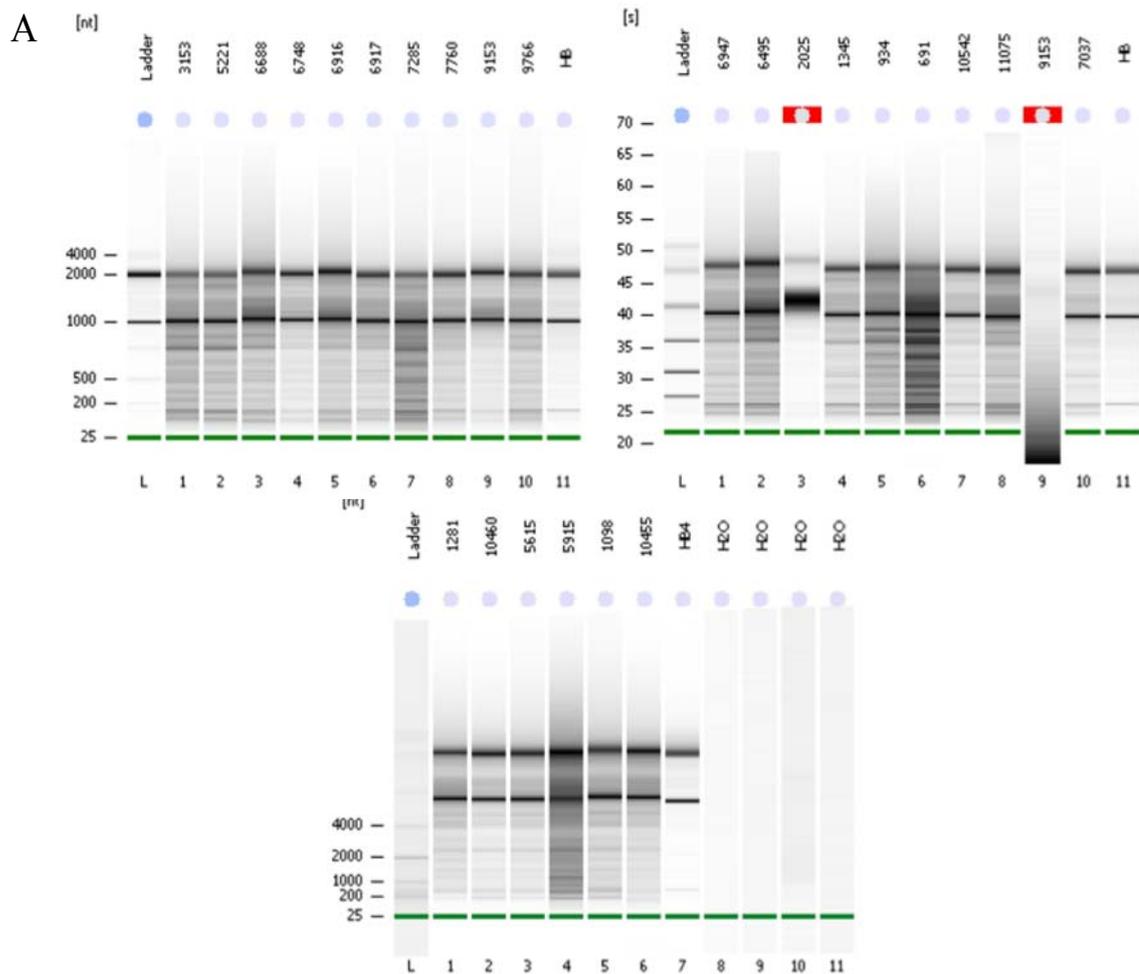
3.8.3 Avaliação da Integridade do RNA total

A qualidade do RNA total das amostras foi analisada através do aparelho Bioanalyser 2100 Agilent (*Agilent Technologies*), que usa detecção de fluorescência, monitorando-a entre 670nm e 700nm. Foi utilizado o RNA 6000 Pico LabChip Kit, no qual a quantidade de amostras a serem avaliadas deve ser extremamente pequena (de 200pg a 5ng). O *software* automaticamente calcula a proporção das áreas dos picos das bandas ribossomais 18S e 28S (relação deve ser \geq a 1) para amostras eucarióticas. É construído um eletroferograma e calculado um número de integridade do RNA (RIN-RNA Integrity Number). O RIN varia de 0 a 10 em ordem crescente de integridade. As amostras com índice inferior ao estabelecido como critério de qualidade (RIN>4) ou relação entre as bandas correspondentes aos RNA ribossomais 28S e 18S menor que 1 foram descartadas. O protocolo utilizado foi o fornecido pelo fabricante. O eletroferograma das amostras testadas está demonstrado na figura 8.

3.8.4 Síntese de cDNA

A partir de RNA total, foi realizada a síntese de cDNA. Para essa reação foram utilizados 2µg de RNA total e 1,0µl de 0,3µg/µl Oligo dT (24) -T7 primer (5'AAA CGA CGG CCA GTG AAT TGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG CGC T (24) 3') [57-mer] em um volume total de 6,7µl. Esse *primer* carrega o promotor do fago T7 bacteriano, que será utilizado para a transcrição *in vitro*. O RNA total com o *primer* Oligo dT (24) -T7 foi desnaturado a 70oC por 10 minutos e esfriado em gelo e então adicionado 4,0µl ImpromTM II 5X Reaction Buffer (*Promega*), 4,8µl de MgCl₂ 25mM (*Promega*), 0,5µl RNaseIN (*Promega*), 2,0µl dNTP4210mM (*Pharmacia*) e 1,0µl ImProm-IITM Reverse Trascriptase (*Promega*). A síntese do

cDNA é completada após 2h a 42°C. O mesmo protocolo foi utilizado para a síntese de cDNA nas amostras referência. Para essas amostras, testamos as linhagens HEK293 e T98G de cérebro como RNA/cDNA referência, cedida pelo laboratório de genômica e biologia molecular.



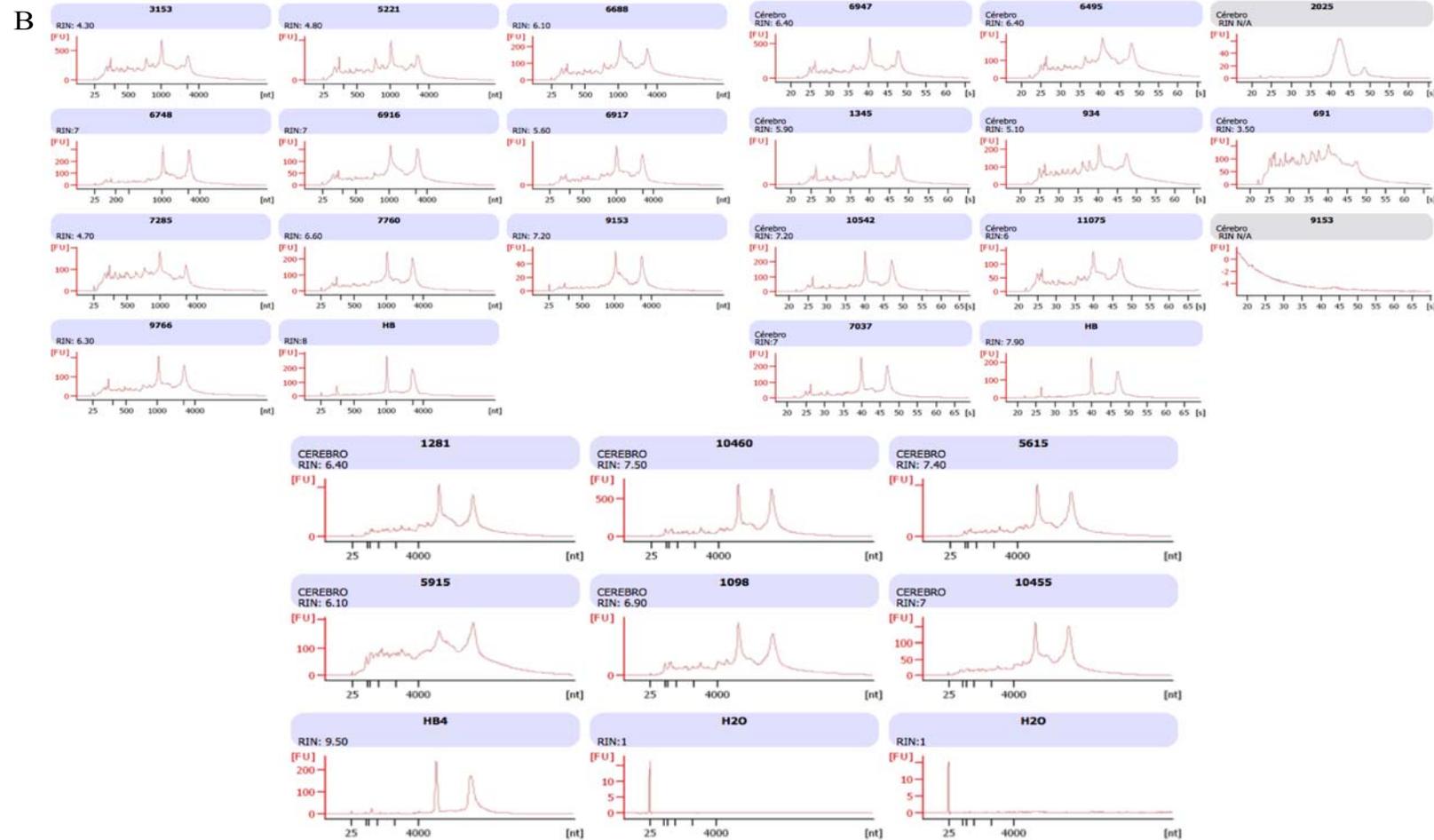


Figura 8 - Teste de integridade do RNA das amostras do presente projeto. [A] Géis de capilar do teste de integridade e qualidade da extração de RNA das amostras de tecido cerebral (vermelho); [B] e eletroferograma mostrando os picos das bandas ribossômicas 18S e 28S.

3.8.5 Avaliação das linhagens

Para avaliação de qual linhagem pode ser usada como referência, foi feita uma PCR convencional e utilizado como controle positivo o gene GAPDH. A linhagem que obteve melhor amplificação nos genes propostos foi a linhagem cerebral T98G.

3.8.6 Desenho dos oligonucleotídeos para o RT-qPCR

O desenho dos primers foi feito pelo programa PRIMER 3 (Disponível em - <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) (ROZEN e SKALETSKY 2000). Os parâmetros considerados foram: tamanho dos oligonucleotídeos (15 – 20 nucleotídeos), conteúdo de G/C em torno de 50 %, temperatura de anelamento (60°C), e tamanho do amplicon (de 50 a 220 pb). Os oligonucleotídeos foram sintetizados pela empresa Sigma - Aldrich (Brasil) (Quadro 6).

Os oligonucleotídeos sintetizados foram inicialmente testados na temperatura de anelamento desejada (60°C) pelo método da PCR convencional. A especificidade do produto de amplificação foi verificada em gel de agarose 2 %.

Os oligonucleotídeos dos genes normalizadores utilizados foram cedidos pelo laboratório de genômica e biologia molecular. Os genes foram testados foram ActB, GAPDH, GusB e HPRT1.

3.8.7 RT-qPCR

Todas as reações foram realizadas no aparelho *7900HT Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). Inicialmente, foi realizada uma padronização do método que inclui escolha do normalizador adequado; teste de eficiência de

amplificação dos oligonucleotídeos; determinação da quantidade de cDNA molde; ajustes na concentração final dos oligonucleotídeos e avaliação das condições de termociclagem.

O método de quantificação usado foi o *SYBR® Green PCR Master Mix™*, que é um agente fluorescente que se intercala em fitas duplas de DNA e emite grande quantidade de fluorescência. Desta forma, a detecção do aumento de produtos de PCR gerados ao longo de cada ciclo, é feito proporcionalmente ao aumento da fluorescência emitida pelo *SYBR® Green PCR Master Mix*. No método, o equipamento detecta, a cada ciclo, uma elevação de sinal fluorescente e constrói uma curva de amplificação em tempo real (intensidade de fluorescência x curva).

O volume final da reação foi 20ul e concentração do *MasterMix™* foi utilizado de acordo com as regras do fabricante. O desenho dos primers e concentração dos primers e cDNA estão descritos no Quadro 6. As condições utilizadas foram as universais de ciclagem, sugeridas pelo fornecedor. Ao final da amplificação, adicionou-se uma etapa de 20 minutos de duração, na qual a temperatura aumenta gradualmente de 60°C para 95°C a 0,2°C por segundo com a contínua aquisição da fluorescência, para se ter uma análise da curva de dissociação, utilizada para confirmação da especificidade da amplificação. As reações foram realizadas em duplicata em placas de 96 poços (*MicroAmp® Optical*, Applied Biosystems). O gene normalizador, *GAPDH*, foi definido através do *GeNorm* Microsoft Excel VBA script (VANDESOMPELE et al. 2002). O cálculo da eficiência dos iniciadores tem por objetivo analisar se a eficiência de amplificação dos iniciadores dos genes de interesse é similar à eficiência de amplificação dos iniciadores dos genes normalizadores.

Para o cálculo da eficiência dos iniciadores serão realizadas, para cada par de iniciador, reações em duplicata utilizando cinco diluições seriadas de cDNA (50ng; 10ng; 5ng; 0,5ng e 0,05ng). A partir dos resultados da reação será construído um gráfico (curva padrão) que relaciona os Cts (Threshold Cycle – ciclo no qual é detectada a fluorescência) com o valor das quantidades de cDNA em logaritmo de base 10. O valor correspondente ao coeficiente angular (slope) da equação da reta da curva padrão ($y = ax + b$) foi utilizado na seguinte fórmula matemática:

$$\text{Eficiência} = 10^{-1/\text{slope}} - 1.$$

Quadro 6 - Sequencia dos *primers* e condições de PCR utilizados.

Gene	Sequencia de Primers (→5')	Tamanho do Amplicon	Condições de PCR	
			Primers	cDNA
ATM	CTGACCTTCACCCCTAC GTCCCTTCTTCCACTC	139pb	600mM	10ng
BRCA1	CTGGACAGAGGACAATG GTCTACTACTGTCCAAC	89pb	600mM	30ng
P53	CTGAATGAGCCCTTGG GTAGACTGACCCTTTTTG	123pb	600mM	10ng
PARP1	GATAAGCTCTATCGAATC CATCCACCTCAACGTC	202pb	800mM	30ng
PTEN	CCAACCGATACTTTTCTC GATTTGACGCGCTCCTC	72pb	800mM	10ng
Rb	GAGGAGAGTCCAAATTTC GCTTTTGCATTGCTGTTC	66pb	600mM	10ng

Para o cálculo da quantificação relativa de cada gene será utilizada a média dos Cts das duplicatas do gene de interesse e do normalizador conforme o modelo proposto por PFAFFL (2001).

3.8.8 Análise Estatística

Para a comparação da expressão gênica dos genes supressores de tumor, entre os três grupos, utilizamos o teste de Kruskal-Wallis. Para comparação de Patologia: Doente (asDA + DA) *versus* indivíduos de envelhecimento normal e comparação entre DA *versus* indivíduos com envelhecimento normal, foi realizado o teste de Wilcox. Os testes foram realizados no pacote estatístico do R, no departamento de bioinformática e bioestatística do CIPE – A.C. Camargo.

5 RESULTADOS

5.1 AMOSTRAS FFPE

As estatísticas descritivas das amostras em FFPE estão descritas na Tabela 1. Não encontramos nenhuma diferença estatisticamente significativa, testada por ANOVA, nos intervalos post mortem, nem nas idades entre os três grupos estudados.

Tabela 1 - Análise descritiva das amostras FFPE estudadas

Grupos	Número de casos estudados	Sexo		Idade (anos)		IPM (Horas)		
		Feminino	Masculino	Média	Mediana	Varição	Média	Mediana
Normal	31	16	15	84,52	83	9 - 23	14,42	14,17
asDA	13	8	5	86,23	85	9,63 - 24,17	13,73	13
DA	20	17	3	85,5	83	4,92 - 20,82	14,57	14,42

5.1.1 Imunohistoquímica

Em uma análise inicial, comparamos os escores dos três grupos, DA, asDA e indivíduos com envelhecimento normal usando o FBST.

Todas as análises foram feitas tecido-específicas e os resultados (p-valores) de cada marcador com suas respectivas comparações estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Probabilidades calculadas a partir da análise bayesiana (FBST) na comparação dos escores para os marcadores de danos de biomoléculas e reparo de DNA.

Marcadores	Região	p-valor
		DA x asDA x N
8OHdG	Hipocampo	0,486
	Córtex Entorhinal	0,034
	Córtex Temporal	0,001
H2AX	Hipocampo	0,305
	Córtex Entorhinal	0,035
	Córtex Temporal	0,095
MDA	Hipocampo	0,249
	Córtex Entorhinal	0,190
	Córtex Temporal	<0,001
ATM	Hipocampo	0,171
	Córtex Entorhinal	0,464
	Córtex Temporal	0,270
P53	Hipocampo	0,909
	Córtex Entorhinal	0,798
	Córtex Temporal	0,882
PARP1	Hipocampo	0,082
	Córtex Entorhinal	0,622
	Córtex Temporal	0,315
PTEN	Hipocampo	0,400
	Córtex Entorhinal	0,354
	Córtex Temporal	0,050
RB1	Hipocampo	0,529
	Córtex Entorhinal	0,599
	Córtex Temporal	0,787

Em vermelho, as probabilidades menores que 5% (p-valor<0,05). Em laranja, as probabilidades menores que 10% (p-valor<0,1).

Danos a Biomoléculas

8OHdG

Não houve ausência do marcador 8OHdG (Figura 9) em nenhuma das áreas (hipocampo, córtex temporal e córtex entorrinal), assim como em nenhuma das amostras. A ausência de negatividade pode ser reflexo da seleção das amostras, onde os pacientes analisados são todos idosos, com idade média de 85,19 anos, e a mediana de 83 anos.

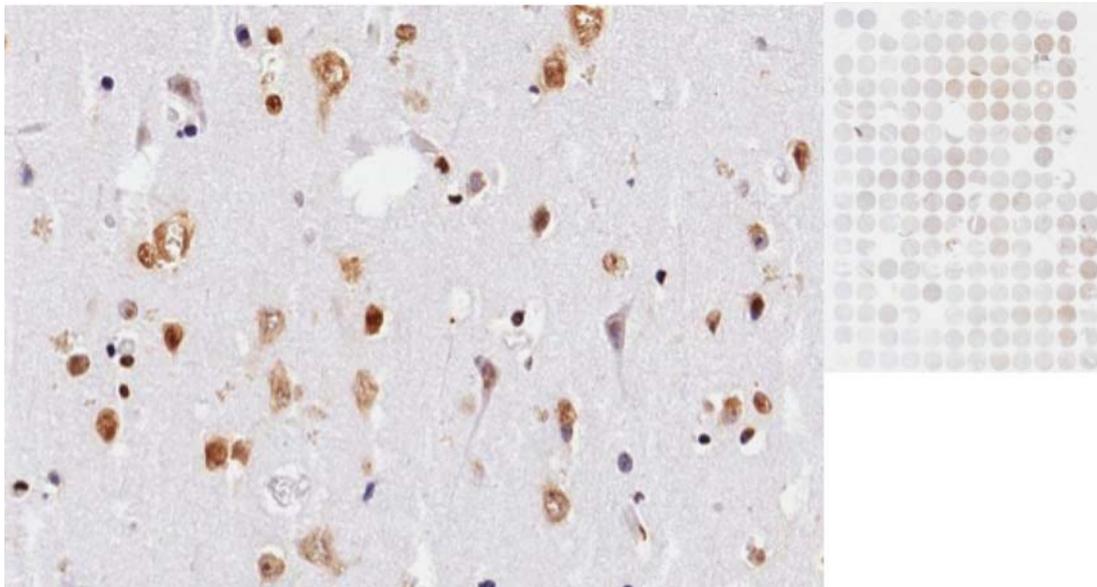


Figura 9 - Imagem do TMA e imunohistoquímica (aumento de 20x) do marcador 8OHdG, evidenciando as marcações citoplasmáticas e nucleares. Imagem escaneada pelo sistema ScanScope da Aperio e visualizada pelo programa ImageScope.

Marcação nuclear

No hipocampo, por meio da análise bayesiana, não achamos diferença estatisticamente significativa para nenhuma das comparações.

No córtex entorrinal, entre os três grupos mostrou uma diferença estatisticamente significativa. Essa diferença muito provavelmente deve-se às diferenças entre os indivíduos normais e DA.

No córtex temporal encontramos uma grande diferença na comparação dos 3 grupos (p-valor=0,001).

É importante notar que o grupo DA apresenta uma grande frequência nos maiores escores e desta forma na quantidade de dano de DNA, em todas as áreas amostradas (hipocampo, córtex entorrinal e temporal).

Marcação citoplasmática

Não encontramos nenhuma diferença estatisticamente significativa para nenhuma das comparações em hipocampo e córtices para a marcação citoplasmática, por meio da análise bayesiana.

H2AX

A H2AX é um sensor de dano de DNA que é imediatamente fosforilado (γ H2AX) e é recrutado para o *foci* do dano quando ocorrem quebras de dupla fita. Como esperado, a histona fosforilada foi encontrada em nossas amostras com marcação no núcleo celular (Figura 10).

Diferente do 8OHdG, o marcador γ H2AX teve uma expressão considerada de leve a moderada, mas, assim como no marcador anterior, sempre positiva em todas as áreas, de todos os pacientes analisados.

No hipocampo não há diferença estatisticamente significativa para nenhuma das comparações.

No córtex temporal, os assintomáticos seguem uma tendência na frequência dos escores mais similar com os indivíduos de envelhecimento normal do que indivíduos com DA sintomática.

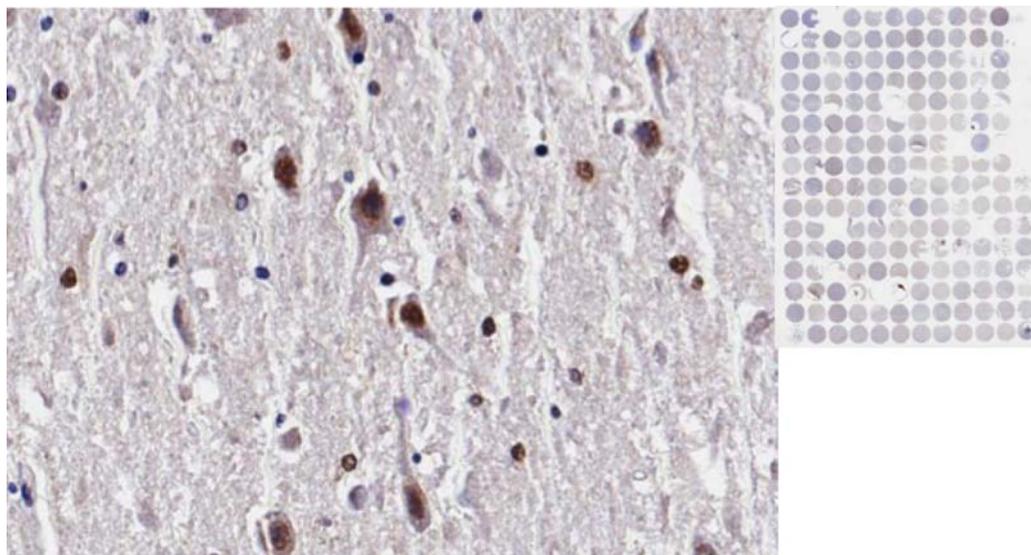


Figura 10 - Imagem do TMA e imunohistoquímica (aumento de 20x) da forma fosforilada da histona γ H2AX, evidenciando as marcações nucleares. Imagem escaneada pelo sistema ScanScope da Aperio e visualizada pelo programa ImageScope.

No córtex entorrinal a comparação entre os 3 grupos mostrou uma diferença estatisticamente significante. Essa diferença muito provavelmente deve-se às diferenças nos menores scores entre os indivíduos normais e DA sintomática.

Malondialdeído - MDA

O MDA é um dialdeído de três carbonos, altamente reativo, formado naturalmente a partir da peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados e do metabolismo do ácido araquidônico. Este marcador foi encontrado, assim como esperado, no citoplasma de indivíduos com DA. Diferente dos outros marcadores de danos de DNA, este marcador não apresentou 100% de positividade no TMA, observando-se alguns cores negativos (Figura 15).

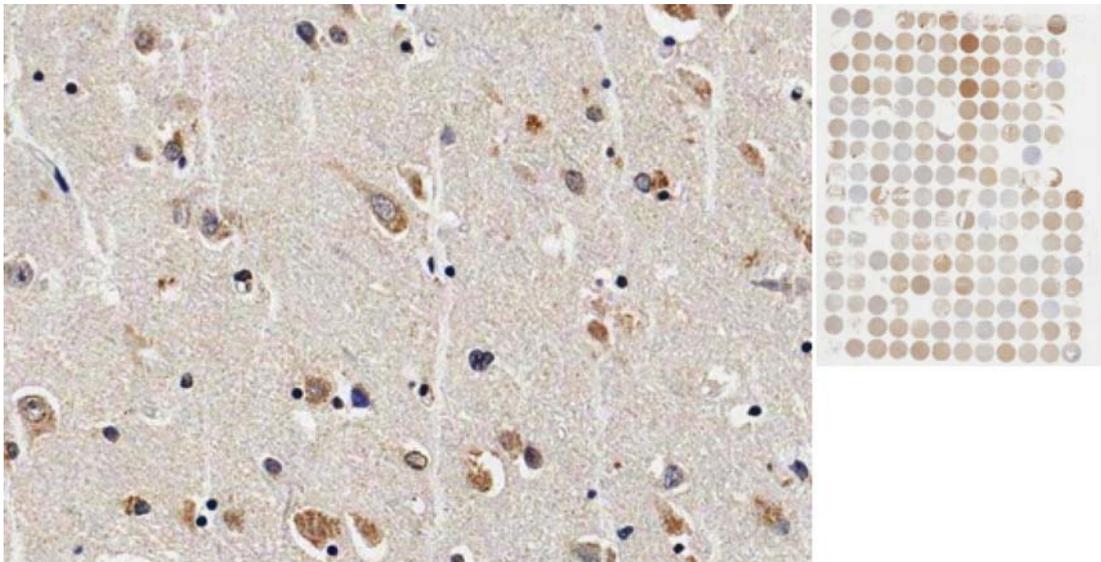


Figura 11 - Imagem do TMA e imunohistoquímica (aumento de 20x) do marcador de oxidação de lipídios malondialdeído, evidenciando as marcações citoplasmáticas.

Imagem escaneada pelo sistema ScanScope da Aperio e visualizada pelo programa ImageScope.

No hipocampo e no córtex entorrinal não há diferença estatisticamente significativa para nenhuma das comparações.

No córtex temporal, todas as comparações mostraram diferença estatisticamente significativa.

Supressores de Tumor

Não foi possível realizar a imunohistoquímica do marcador BRCA1. O produto do gene BRCA1 perdeu sua especificidade como mostrado na Figura 12, provavelmente pela mudança no kit de revelação.

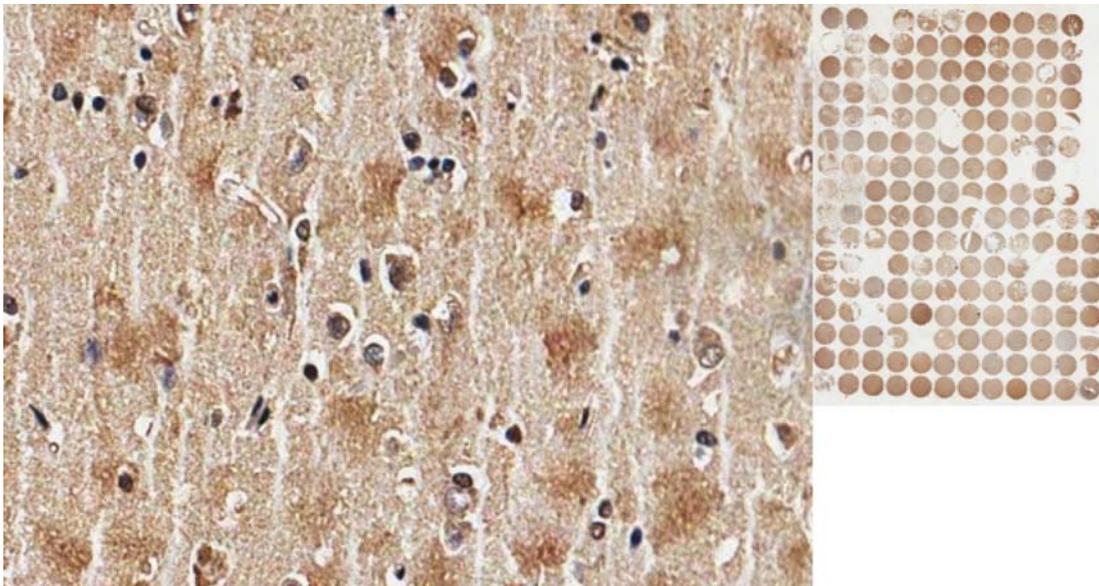


Figura 12 - Imagem do TMA e imunohistoquímica (aumento de 20x) do produto do gene supressor de tumor BRCA1, evidenciando a perda de especificidade do anticorpo. Imagem escaneada pelo sistema ScanScope da Aperio e visualizada pelo programa ImageScope.

ATM

O produto gênico de ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) codifica um produto da família fosfatidilinositol-3 cinase, e é ativado em resposta ao dano de DNA e a mudanças no estado redox intracelular (GUO et al. 2010). A marcação do supressor de tumor ATM foi fraca nas amostras (Figura 13).

Por essa análise, não houve diferença estatisticamente significativa para nenhuma das áreas realizadas.

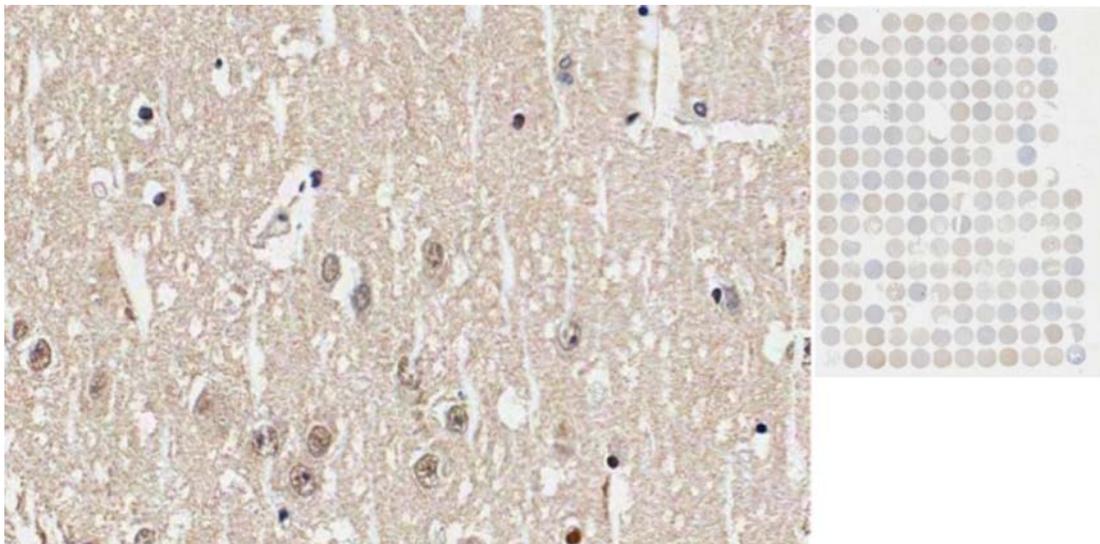


Figura 13 - Imagem do TMA e imunohistoquímica (aumento de 20x) da proteína do supressor de tumor ATM, evidenciando as fracas marcações nucleares. Imagem escaneada pelo sistema ScanScope da Aperio e visualizada pelo programa ImageScope.

p53

O TP53 é um gene supressor tumoral que tem como principais atuações a parada do ciclo celular ou a apoptose. Assim como o produto do gene ATM, na presente análise, o produto do gene TP53 apresentou uma reatividade baixa, exibindo uma marcação discretamente nuclear (Figura 14).

Não houve nenhuma diferença estatisticamente significativa para nenhuma das análises realizadas.

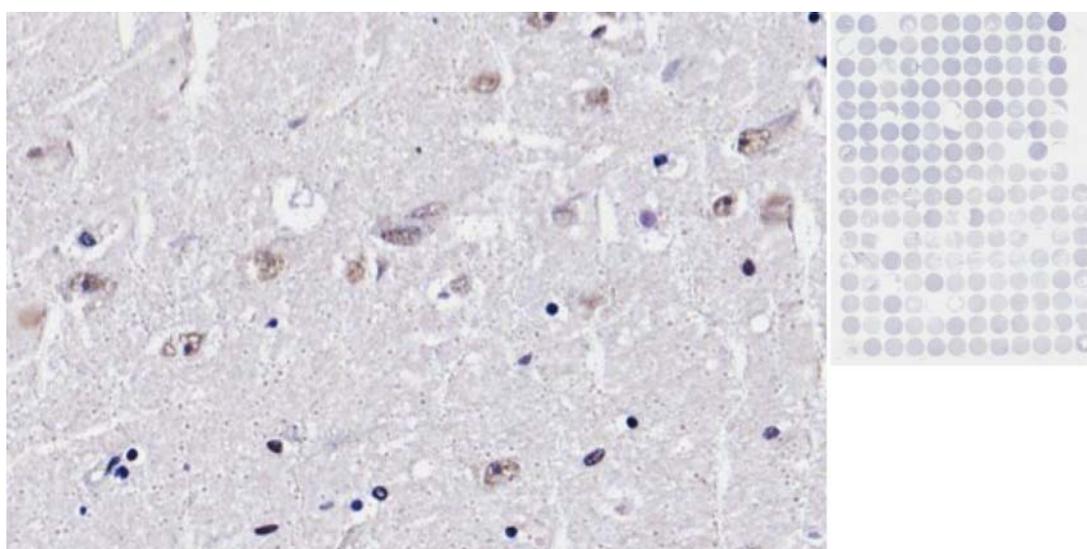


Figura 14 - Imagem do TMA e imunohistoquímica (aumento de 20x) da proteína pró-apoptótica p53, evidenciando as fracas marcações nucleares. Imagem escaneada pelo sistema ScanScope da Aperio e visualizada pelo programa ImageScope.

PARP1

O gene PARP1 é uma proteína nuclear de 116 kDa e está envolvida em diversos processos celulares e moleculares como detecção de danos de DNA, regulação da transcrição, modificação da cromatina e regulação da maquinaria mitótica. A proteína PARP foi encontrada no núcleo como esperado, mas também no

citoplasma (região perinuclear) dos neurônios de indivíduos com DA. Diferente dos outros supressores de tumor, o produto do gene PARP1 teve uma marcação considerada forte, porém não apresentou positividade em todos os cores da lâmina, observando-se alguns cores negativos (Figura 15).

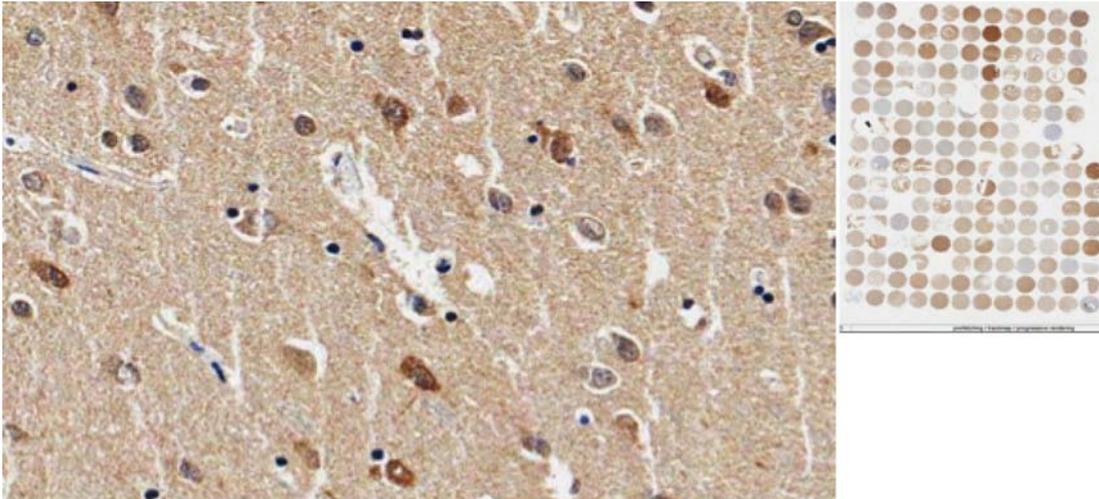


Figura 15 - Imagem do TMA e imunohistoquímica (aumento de 20x) da proteína do supressor de tumor PARP1, evidenciando a intensa imunoreatividade citoplasmática e a fraca imunoreatividade nuclear. Imagem escaneada pelo sistema ScanScope da Aperio e visualizada pelo programa ImageScope.

Marcação Nuclear

Não houve nenhuma diferença estatisticamente significativa quando analisamos a expressão nuclear desse marcador.

Marcação Citoplasmática

No hipocampo encontramos uma diferença significativa na comparação entre os três grupos.

Nos córtices entorrinal e temporal, todos os grupos apresentam uma distribuição de escores bem similar e, dessa forma, não houve uma diferença estatisticamente significante nessas regiões, $p\text{-valor}_{\text{entorrinal}}=0,62$ e $p\text{-valor}_{\text{temporal}}=0,31$.

PTEN

O produto do gene PTEN funciona tanto como tirosina cinase, quanto como lipídio fosfatase. Como lipídio fosfatase atuando no citoplasma, PTEN regula os níveis intracelulares de fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PIP₃) por desfosforilação, gerando fosfatidilinositol 3,4 bifosfato. (PIP₂). PIP₃ é um mediador de sobrevivência celular que, em altos níveis, resulta no bloqueio da progressão do ciclo celular em G1 e na regulação negativa do proto-oncogene PKB/AKT. Em nosso trabalho, o produto do gene PTEN foi encontrado com marcação no núcleo celular, não desempenhando provavelmente sua função de lipídio fosfatase. Assim como o produto do gene PARP1, o PTEN teve uma marcação considerada forte, porém não apresentou positividade em todos os cores da lâmina (Figura 16).

No hipocampo e no córtex entorrinal, não há diferença estatisticamente significante para nenhuma das comparações.

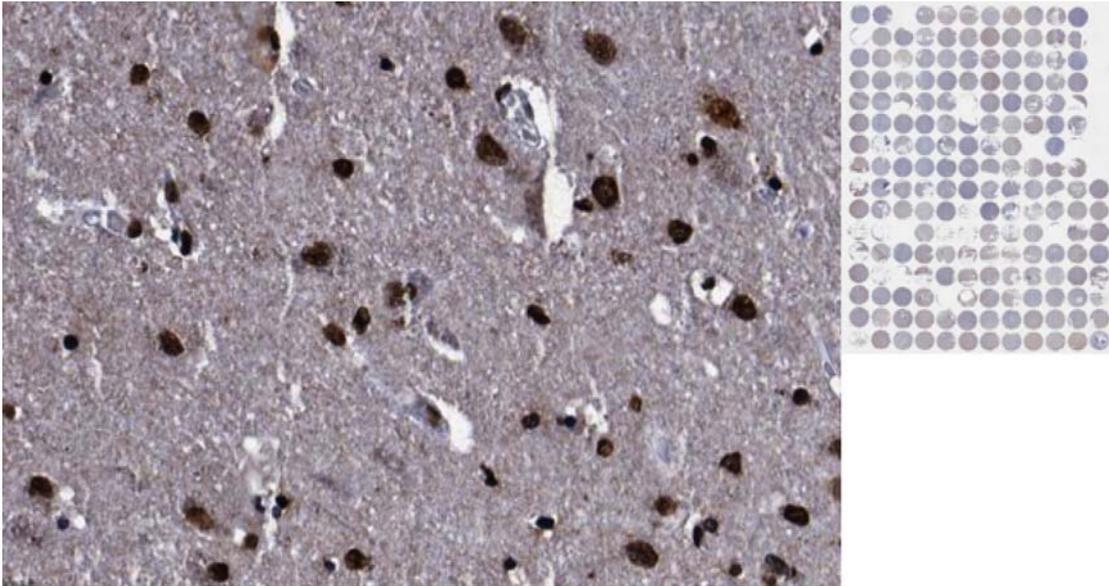


Figura 16 - Imagem do TMA e imunohistoquímica (aumento de 20x) da proteína do supressor de tumor PTEN, evidenciando a intensa imunoreatividade nuclear. Imagem escaneada pelo sistema ScanScope da Aperio e visualizada pelo programa ImageScope.

No córtex temporal, as comparações entre os três grupos mostraram diferença estatisticamente significativa.

RB

Assim como os produtos dos genes ATM e p53, no tecido cerebral observamos uma reatividade reduzida desse anticorpo, apresentando uma marcação discretamente nuclear. É esperado que esse marcador tenha uma discreta marcação, pois o mesmo é responsável também pela progressão do ciclo celular.

Não houve diferença estatisticamente significativa para nenhuma das análises realizadas.

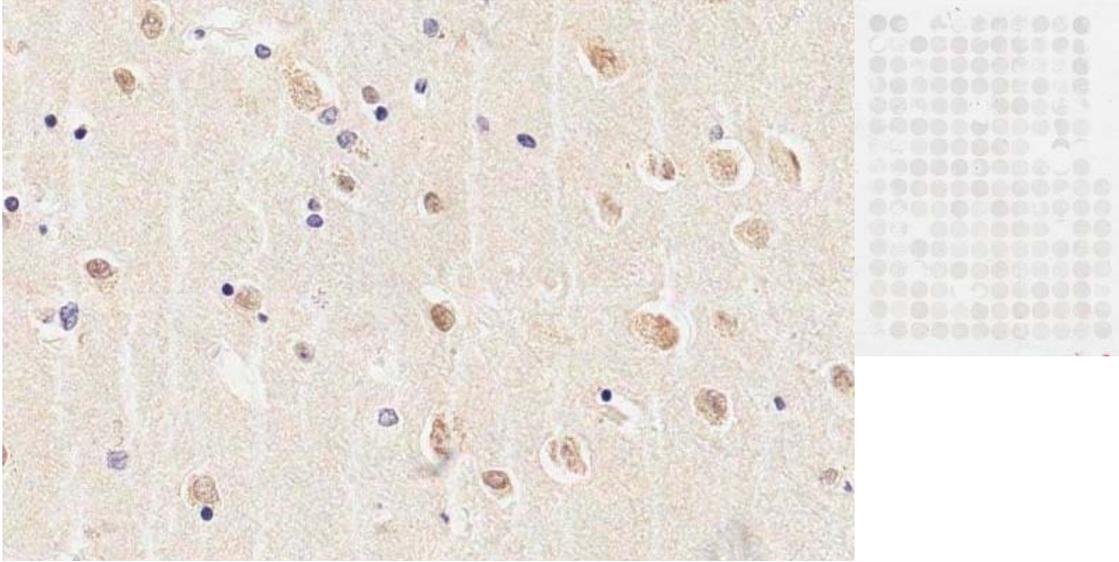


Figura 17 - Imagem do TMA e imunohistoquímica (aumento de 20x) da proteína do supressor de tumor Rb, evidenciando a imunoreatividade nuclear. Imagem escaneada pelo sistema ScanScope da Aperio e visualizada pelo programa ImageScope.

5.1.2 Análise de Verossimilhança

Com o objetivo de melhor entender à distribuição dos escores nos grupos, calculamos a probabilidade da frequência de marcação forte ser maior num dado grupo do que em outro, baseada na distribuição beta. A probabilidade foi calculada entre os grupos dois a dois (DA versus asDA; DA versus Normal; e asDA versus Normal). Dois grupos foram considerados como diferentes quando a probabilidade de um evento ocorrer foi maior que 90%. Os gráficos representativos das distribuições beta estão ilustrados nas Figuras de 18 a 27. As probabilidades de cada marcador, relativo aos escores, relacionando os grupos par a par, estão descritos na Tabela 3.

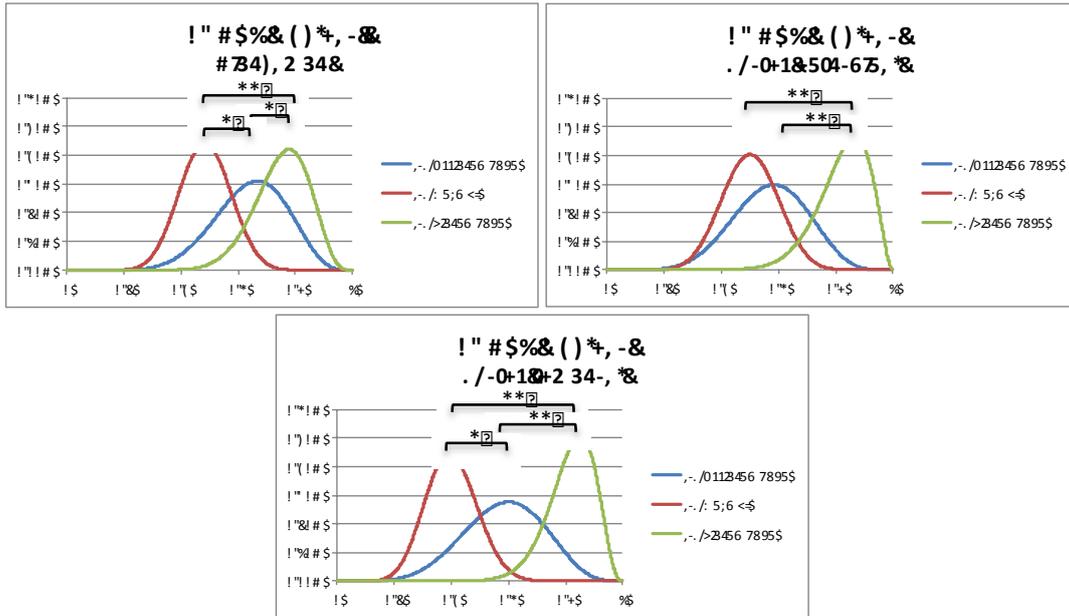


Figura 18 - Distribuição beta dos escores dos indivíduos DA, asDA e de envelhecimento normal em relação ao marcador de dano oxidativo 8OHdG no núcleo neuronal. *probabilidade > 75%; **probabilidade > 90%.

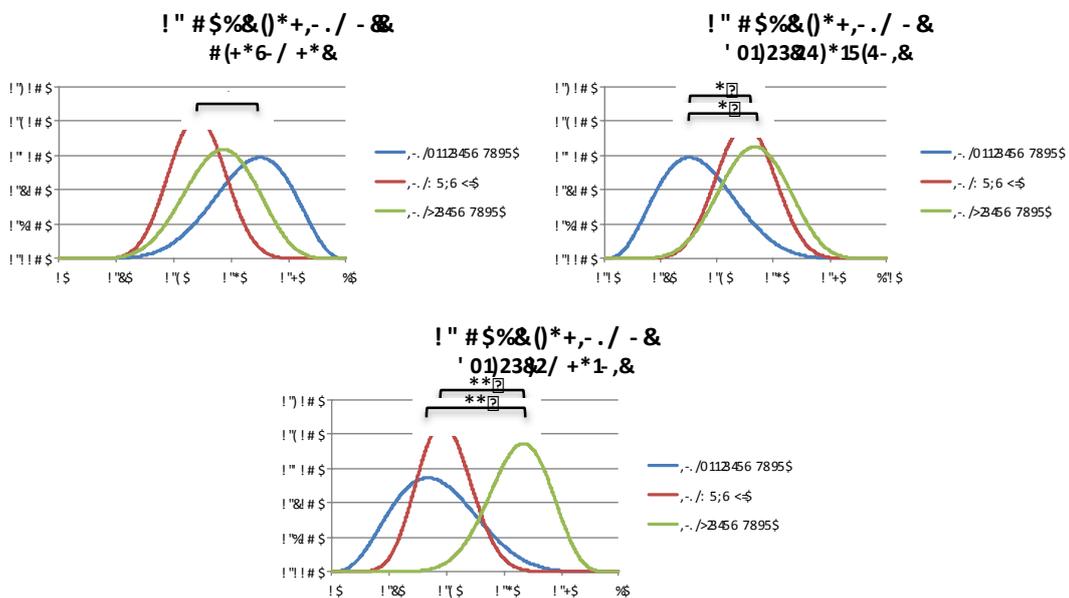


Figura 19 - Distribuição beta dos escores dos indivíduos DA, asDA e de envelhecimento normal em relação ao marcador de dano oxidativo 8OHdG no citoplasma neuronal. *probabilidade > 75%; **probabilidade > 90%.

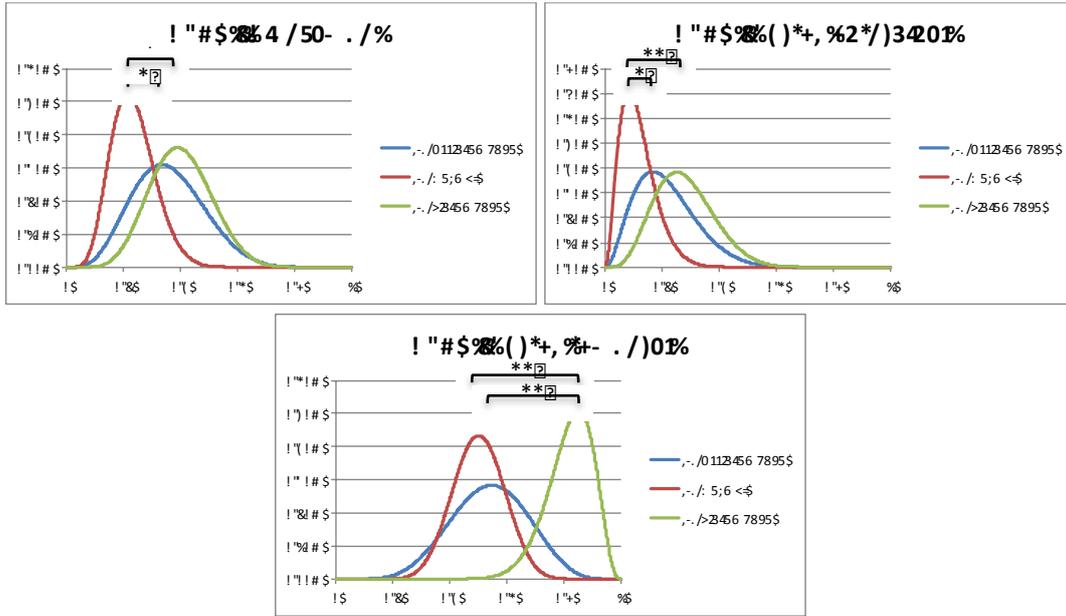


Figura 20 - Distribuição beta dos escores dos indivíduos DA, asDA e de envelhecimento normal em relação ao marcador de dano oxidativo γ H2AX. *probabilidade > 75%; **probabilidade > 90%.

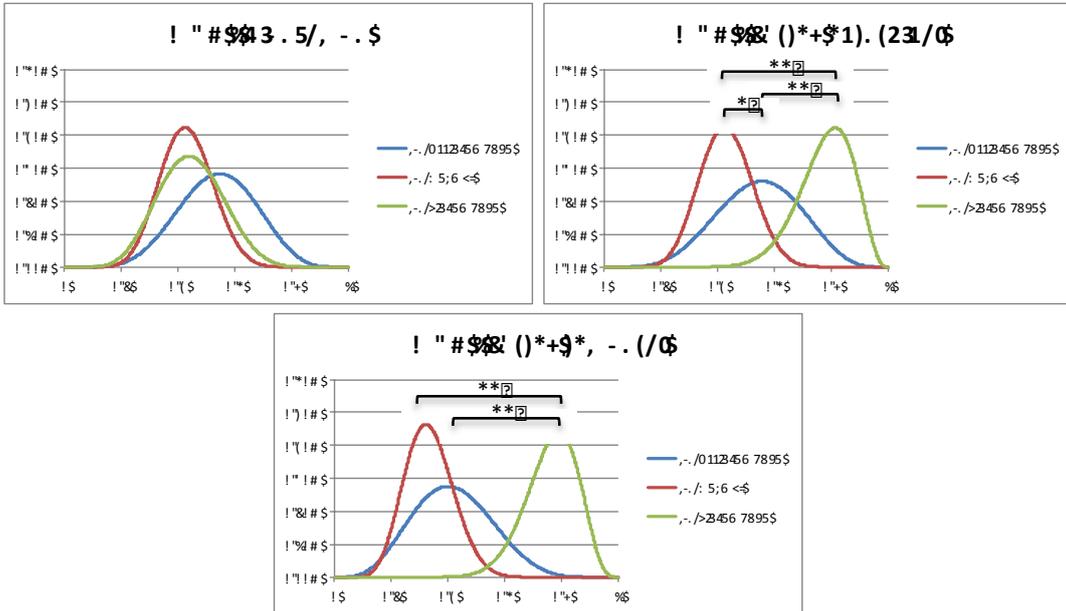


Figura 21 - Distribuição beta dos escores dos indivíduos DA, asDA e de envelhecimento normal em relação ao marcador de dano oxidativo α . *probabilidade > 75%; **probabilidade > 90%.

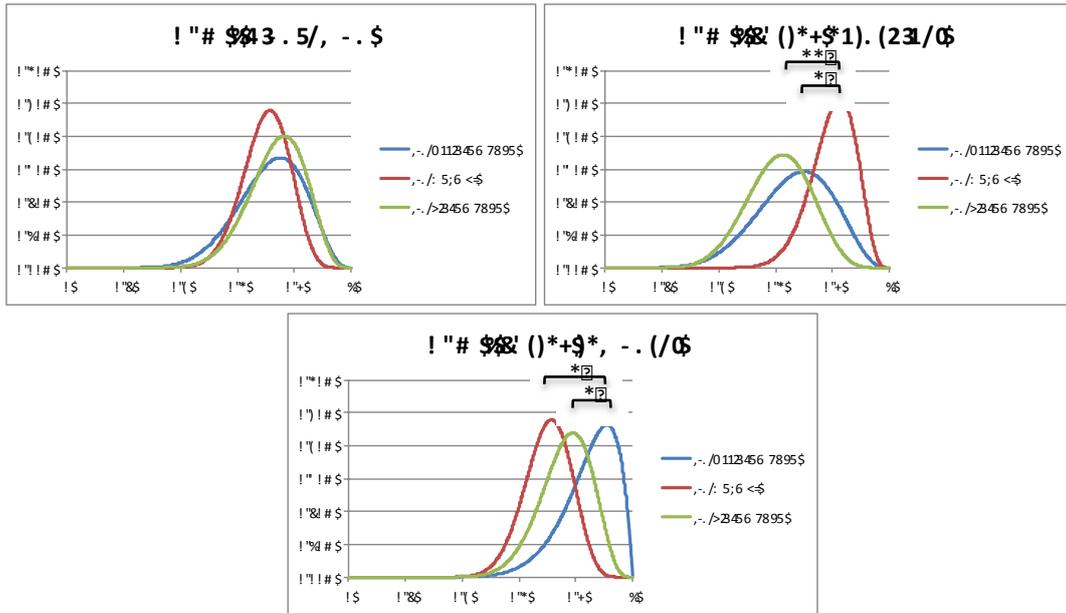


Figura 22 - Distribuição beta dos escores dos indivíduos DA, asDA e de envelhecimento normal em relação ao supressor de tumor ATM. *probabilidade > 75%; **probabilidade > 90%.

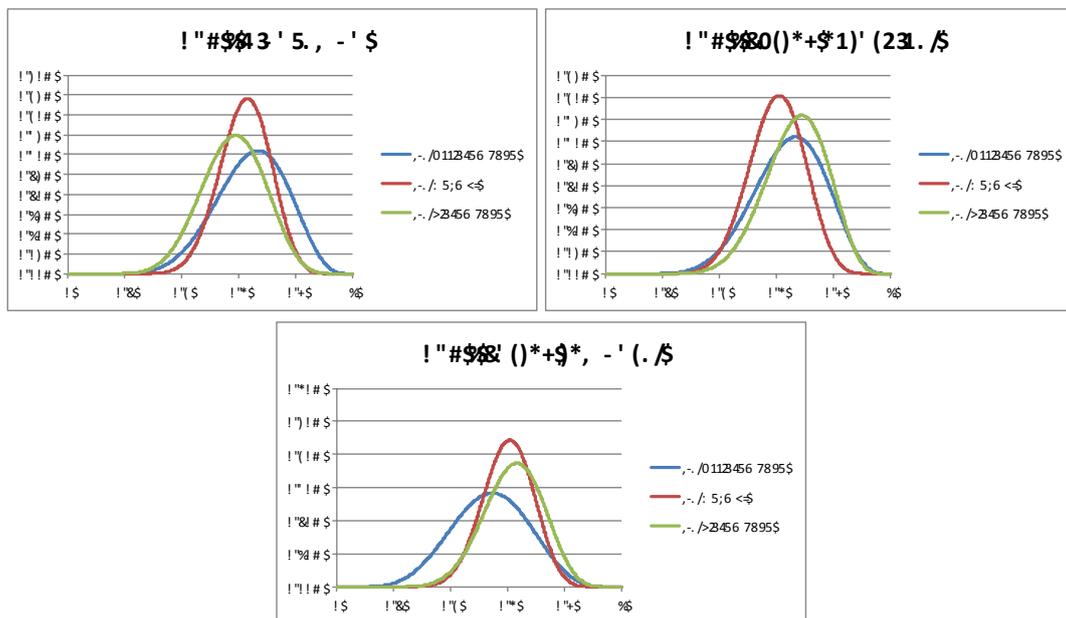


Figura 23 - Distribuição beta dos escores dos indivíduos DA, asDA e de envelhecimento normal em relação ao supressor de tumor p53.

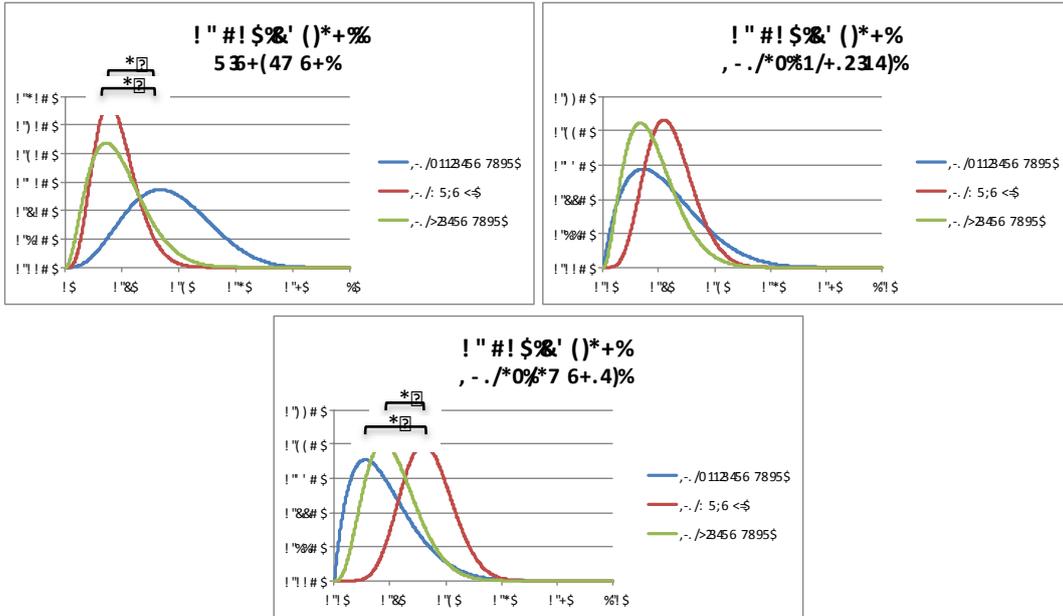


Figura 24 - Distribuição beta dos escores dos indivíduos DA, asDA e de envelhecimento normal em relação supressor de tumor PARP1 nuclear. *probabilidade > 75%; **probabilidade > 90%.

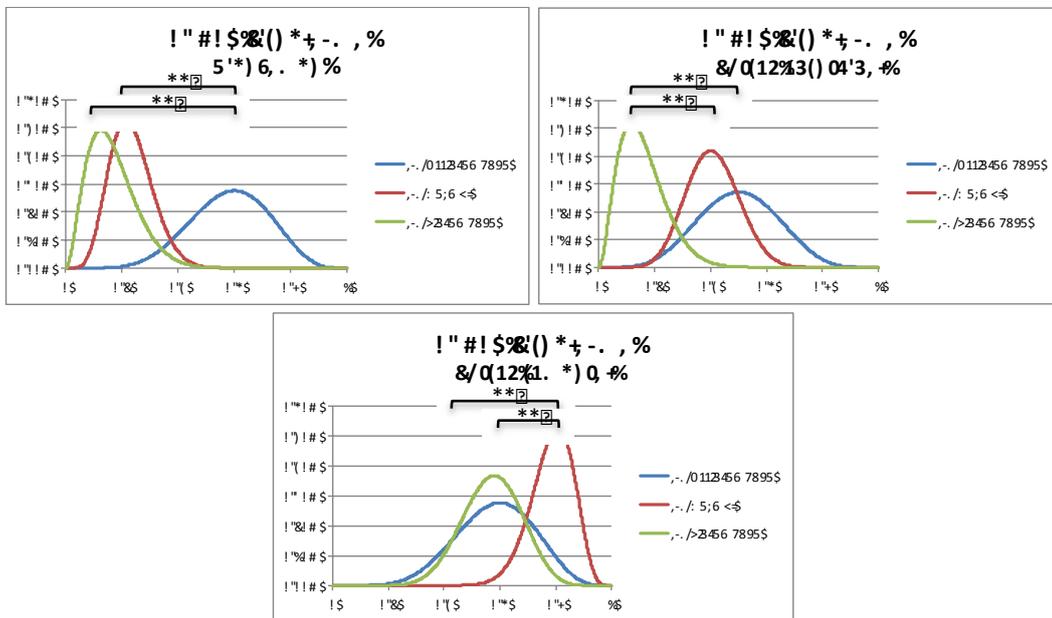


Figura 25 - Distribuição beta dos escores dos indivíduos DA, asDA e de envelhecimento normal em relação supressor de tumor PARP1 citoplasmático. *probabilidade > 75%; **probabilidade > 90%.

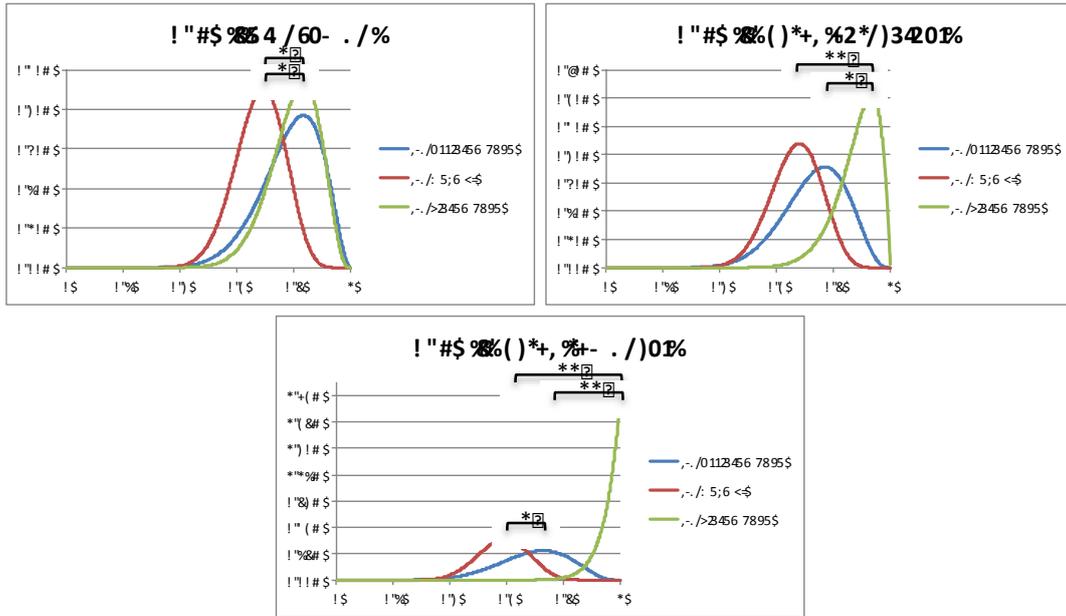


Figura 26 - Distribuição beta dos escores dos indivíduos DA, asDA e de envelhecimento normal em relação supressor de tumor PTEN. *probabilidade > 75%; **probabilidade > 90%.

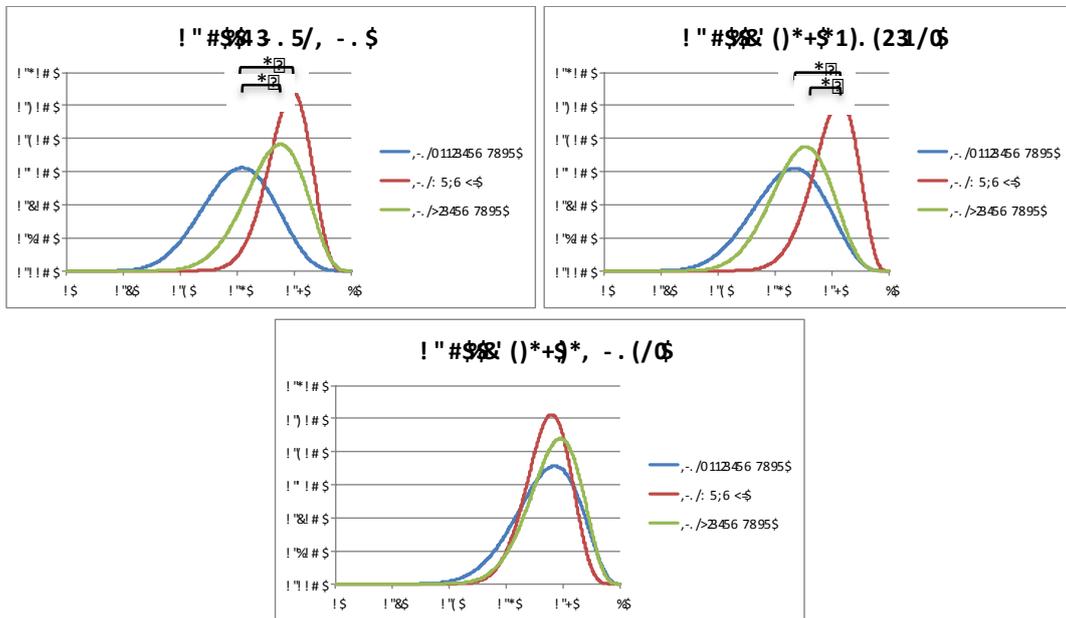


Figura 27 - Distribuição beta dos escores dos indivíduos DA, asDA e de envelhecimento normal em relação ao supressor de tumor RB1. *probabilidade > 75%.

Tabela 3 - Probabilidades de um grupo ter maior marcação forte que outro grupo, calculadas por região analisada, com base na distribuição beta.

Marcadores	Região	Probabilidades		
		S>A	A>N	S>N
8OHdG (Nuclear)	Hipocampo	0,750	0,848	0,975
	Córtex Entorhinal	0,945	0,672	0,989
	Córtex Temporal	0,931	0,864	0,999
8OHdG (citoplasmático)	Hipocampo	0,277	0,869	0,700
	Córtex Entorhinal	0,863	0,159	0,574
	Córtex Temporal	0,943	0,419	0,964
H2AX	Hipocampo	0,606	0,798	0,897
	Córtex Entorhinal	0,673	0,790	0,918
	Córtex Temporal	0,963	0,594	0,993
MDA	Hipocampo	0,296	0,747	0,539
	Córtex Entorhinal	0,909	0,749	0,993
	Córtex Temporal	0,979	0,688	0,999
ATM	Hipocampo	0,551	0,553	0,620
	Córtex Entorhinal	0,367	0,194	0,083
	Córtex Temporal	0,247	0,874	0,698
P53	Hipocampo	0,346	0,565	0,386
	Córtex Entorhinal	0,553	0,612	0,679
	Córtex Temporal	0,679	0,354	0,557
PARP1 (Nuclear)	Hipocampo	0,146	0,883	0,510
	Córtex Entorhinal	0,406	0,422	0,290
	Córtex Temporal	0,600	0,143	0,166
PARP1 (citoplasmático)	Hipocampo	0,007	0,985	0,267
	Córtex Entorhinal	0,018	0,705	0,026
	Córtex Temporal	0,467	0,098	0,050
PTEN	Hipocampo	0,529	0,788	0,838
	Córtex Entorhinal	0,873	0,688	0,962
	Córtex Temporal	0,986	0,758	>0,999
RB1	Hipocampo	0,775	0,111	0,348
	Córtex Entorhinal	0,595	0,141	0,186
	Córtex Temporal	0,570	0,489	0,574

Destacadas em vermelho as probabilidades relevantes, maiores que 75%, de um indivíduo do grupo 1 ter escore maior que do grupo 2. Em verde, as probabilidades relevantes, maior que 75% de chance, de um indivíduo do grupo 2 ter escore maior que do grupo 1. S – Doença de Alzheimer sintomática; A – Doença de Alzheimer assintomática; N – Indivíduos com envelhecimento normal.

5.2 AMOSTRAS CONGELADAS

As estatísticas descritivas das amostras congeladas estão descritas na Tabela 4. Não encontramos nenhuma diferença estatisticamente significativa, testada por ANOVA, nos intervalos post mortem, nem nas idades entre os três grupos estudados.

Tabela 4 - Estatística descritiva das amostras congeladas investigadas no presente estudo.

Grupos	Número de casos estudados	Sexo		Idade (anos)		IPM (Horas)		
		Feminino	Masculino	Média	Mediana	Variação	Média	Mediana
Normal	14	7	7	80	82	6,5 - 16,5	12,68	13,33
asDA	4	3	1	82,5	85,5	9,63 - 16	12,09	11,37
DA	11	9	2	84	83	10,10 - 18,25	13,49	12,38

Com o objetivo de investigar alterações na expressão gênica de genes de reparo de DNA, em última análise supressores de tumor, quantificamos os níveis de mRNA por meio da técnica de RT-qPCR.

5.2.1 RT-qPCR

Nenhum dos genes analisados por RT-qPCR teve diferença estatisticamente significativa da expressão gênica, quando comparamos os 3 grupos (Figura 28) (Tabela 5).

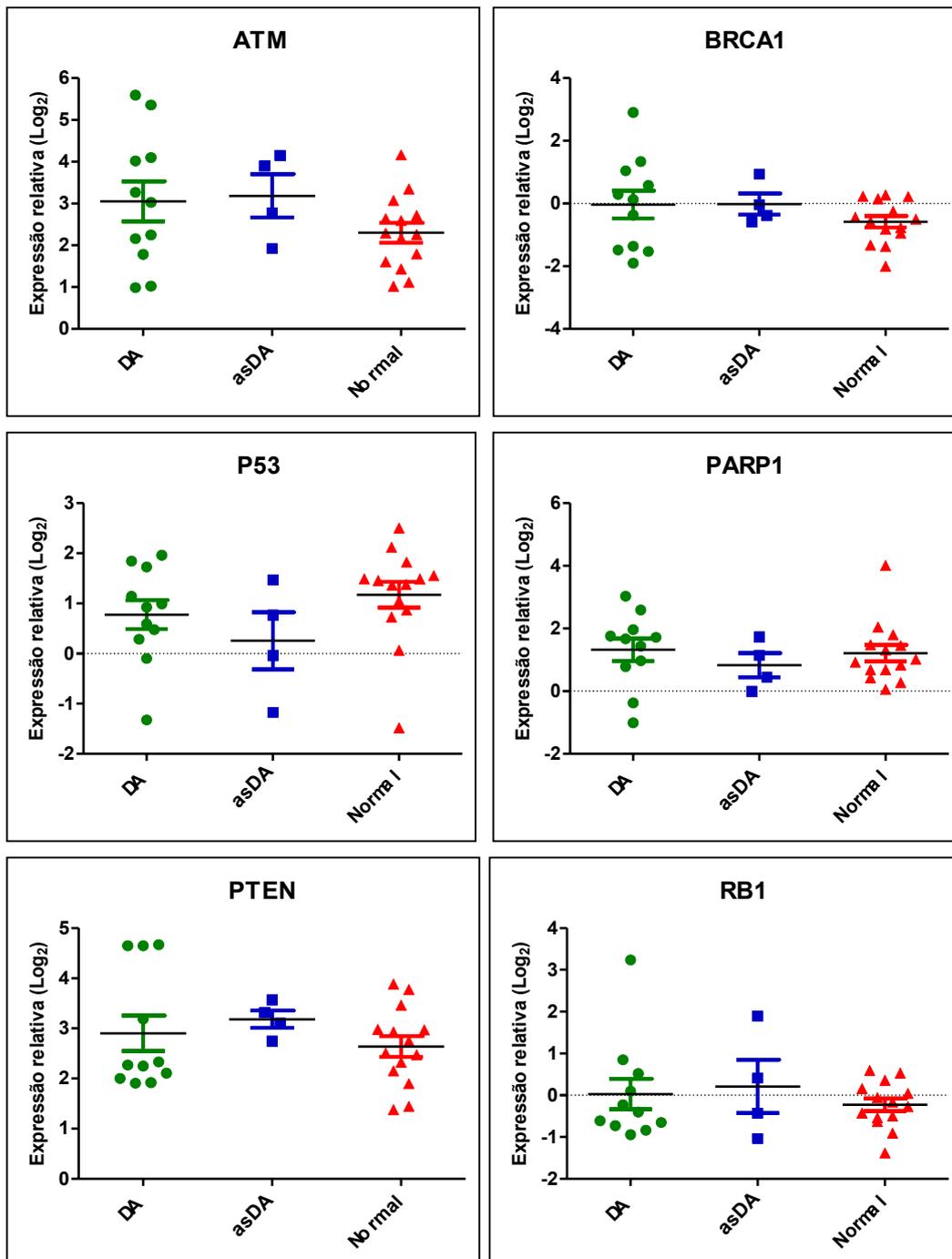


Figura 28 - Representação gráfica da expressão gênica relativa dos supressores de tumor dos 3 grupos analisados. DA – Doença de Alzheimer sintomática; asDA – Doença de Alzheimer assintomática; Normal – Indivíduos com envelhecimento normal.

Tabela 5 - Estatística da descritiva e p-valor da comparação da expressão mensurada por meio do RT-qPCR, entre os 3 grupos estudados.

Marcador	Grupo	n	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo	p*
ATM	Assintomático	4	3,18	1,03	1,92	3,33	4,15	0,3651
	Normal	14	2,30	0,88	1,02	2,27	4,16	
	Sintomático	11	3,05	1,59	0,99	3,03	5,59	
BRCA1	Assintomático	4	-0,01	0,67	-0,58	-0,21	0,94	0,4668
	Normal	14	-0,58	0,69	-2,00	-0,54	0,27	
	Sintomático	11	-0,03	1,48	-1,90	0,12	2,90	
P53	Assintomático	4	0,26	1,14	-1,17	0,36	1,47	0,2084
	Normal	14	0,87	0,87	-1,32	0,96	1,96	
	Sintomático	11	1,16	1,09	-1,48	1,49	2,50	
PARP1	Assintomático	4	0,83	0,77	0,00	0,79	1,74	0,5301
	Normal	14	1,21	0,99	0,06	0,97	4,01	
	Sintomático	11	1,32	1,19	-1,01	1,67	3,03	
PTEN	Assintomático	4	3,18	0,34	2,75	3,21	3,56	0,3768
	Normal	14	2,64	0,77	1,38	2,62	3,88	
	Sintomático	11	2,90	1,18	1,91	2,27	4,67	
RB	Assintomático	4	0,21	1,27	-1,04	-0,01	1,89	0,943
	Normal	14	-0,23	0,56	-1,38	-0,22	0,59	
	Sintomático	11	0,03	1,21	-0,94	-0,40	3,24	

*Kruskal-Walis test. Sintomático – Doença de Alzheimer sintomática; Assintomático – Doença de Alzheimer assintomática; Normal – Indivíduos com envelhecimento normal.

Quando comparamos as medidas de expressão gênica entre indivíduos com envelhecimento normal e indivíduos com a patologia da DA (Alzheimer – DA Sintomáticos + DA assintomáticos) (Tabela 6), também não encontramos diferenças estatisticamente significantes, assim como quando comparamos indivíduos normais com DA sintomática (Tabela 7).

Tabela 6 - Estatística da descritiva e p-valor da comparação da expressão mensurada por meio do RT-qPCR, entre o grupo com patologia da DA e os indivíduos com envelhecimento normal.

Marcador	Grupo	n	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo	p*
ATM	Alzheimer	15	3,09	1,43	0,99	3,03	5,59	0,20
	Normal	14	2,30	0,88	1,02	2,27	4,16	
BRCA1	Alzheimer	15	-0,03	1,29	-1,90	-0,03	2,90	0,23
	Normal	14	-0,58	0,69	-2,00	-0,54	0,27	
P53	Alzheimer	15	0,92	1,14	-1,48	1,46	2,50	0,59
	Normal	14	0,87	0,87	-1,32	0,96	1,96	
PARP1	Alzheimer	15	1,19	1,09	-1,01	1,44	3,03	0,71
	Normal	14	1,21	0,99	0,06	0,97	4,01	
PTEN	Alzheimer	15	2,98	1,02	1,91	2,75	4,67	0,53
	Normal	14	2,64	0,77	1,38	2,62	3,88	
RB	Alzheimer	15	0,08	1,18	-1,04	-0,40	3,24	>0,99
	Normal	14	-0,23	0,56	-1,38	-0,22	0,59	

*Wilcox test. Alzheimer – Doença de Alzheimer sintomática + Doença de Alzheimer assintomática; Normal – Indivíduos com envelhecimento normal.

Tabela 7 - Estatística da descritiva e p-valor da comparação da expressão mensurada por meio do RT-qPCR, entre os indivíduos com envelhecimento normal e os pacientes DA sintomáticos.

Marcador	Grupo	n	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo	p*
ATM	Normal	14	2,30	0,88	1,02	2,27	4,16	0,4
	Sintomático	11	3,05	1,59	0,99	3,03	5,59	
BRCA1	Normal	14	-0,58	0,69	-2,00	-0,54	0,27	0,37
	Sintomático	11	-0,03	1,48	-1,90	0,12	2,90	
P53	Normal	14	0,87	0,87	-1,32	0,96	1,96	0,24
	Sintomático	11	1,16	1,09	-1,48	1,49	2,50	
PARP1	Normal	14	1,21	0,99	0,06	0,97	4,01	0,43
	Sintomático	11	1,32	1,19	-1,01	1,67	3,03	
PTEN	Normal	14	2,64	0,77	1,38	2,62	3,88	0,98
	Sintomático	11	2,90	1,18	1,91	2,27	4,67	
RB	Normal	14	-0,23	0,56	-1,38	-0,22	0,59	0,85
	Sintomático	11	0,03	1,21	-0,94	-0,40	3,24	

*Wilcox test. Sintomático – Doença de Alzheimer sintomática; Normal – Indivíduos com envelhecimento normal.

6 DISCUSSÃO

6.1 DANOS DE DNA

A hipótese dos radicais livres/estresse oxidativo no envelhecimento, proposta em 1956 por Denham Harman (revista por BECKMAN e AMES 1998), postula que radicais livres produzidos pela respiração aeróbica causam acúmulo de danos oxidativos, resultando em envelhecimento e morte. Atualmente, sabe-se que os danos oxidativos atingem a maioria dos componentes celulares: núcleo, DNA mitocondrial, membranas e proteínas citoplasmáticas (HALLIWELL e GUTTERIDGE 2007). O desbalanço entre a produção de radicais livres/ROS e os mecanismos compensatórios desse estresse, isto é, os sistemas de defesa, sinalização e reparo, podem estar envolvidos na patogênese da maioria das doenças neurodegenerativas, incluindo doença de Alzheimer (DA), como sugerido por alguns autores (ZHU et al. 2004, 2007; MOREIRA et al. 2008).

Está claro que o estresse oxidativo está presente na DA em todas as fases, inclusive no grupo asDA (ZHU et al. 2005; DING et al. 2006; MARKESBERY et al. 2005; WANG et al. 2006; WILLIAMS et al. 2006; LOVELL e MARKESBERY 2007a e b; SHAO et al. 2008; ALUISE et al. 2010; LOVELL et al. 2011; TORRES et al. 2011; BRADLEY et al. 2012, 2012). Recentes pesquisas demonstram que o dano oxidativo está intimamente relacionado aos estágios iniciais do processo de declínio cognitivo na transição para a DA (NUNOMURA et al. 2012; ZHU et al. 2012).

Neste trabalho, observamos que alterações em marcadores de dano oxidativo em DNA e lipídeos estão presentes em casos e controles, o que é esperado uma vez que nossa população apresenta idade média de 85,18 anos e que, com o envelhecimento, ocorre o acúmulo de tais danos. Porém, nossas análises corroboram uma diferença significativa na doença de Alzheimer em relação a indivíduos com a neuropatologia e não dementados – grupo asDA e em indivíduos com envelhecimento normal, pareados por idade. No entanto, observamos diferenças que serão discutidas a seguir, referentes à localização dos achados dos marcadores de dano.

O 8OHdG, uma modificação desoxirribonucleica resultante de um insulto oxidativo, mostrou-se o marcador de dano mais alterado na DA, como já descrito em zonas neocorticais (MECOCCI et al. 1994; GABBITA et al. 1998; LOVELL et al. 1999; NUNOMURA et al. 1999, 2001; WANG et al. 2005, 2006; LOVELL e MARKESBERY 2007a; LOVELL et al. 2011), assim como em fluidos biológicos (MECOCCI et al. 1998; TEUNISSEN et al. 2002; LEE et al. 2007; GACKOWSKI et al. 2008; DORSZEWSKA et al. 2005, 2009).

No que se refere à oxidação do mtDNA no hipocampo e córtex entorrinal, locais de início da DA, não encontramos diferenças relevantes no 8OHdG na comparação de DA e indivíduos normais. Esses resultados corroboram o estudo de TE KOPPELE et al. (1996), que mensurou o dano por HPLC, e de LYRAS et al. (1996), que utilizou cromatografia gasosa/espectrometria de massa. Ambos não encontraram diferenças significativas na presença de 8OHdG no mtDNA entre os pacientes com DA e controles no hipocampo. Diferente desses resultados, NUNOMURA et al. (1999) demonstraram essas diferenças na expressão de 8OHdG

no citoplasma neuronal do hipocampo e córtex entorrinal, porém neste trabalho foram analisados hipocampo e regiões adjacente, incluindo córtex entorrinal num mesmo corte.

No que se refere à comparação entre asDA e indivíduos normais, no hipocampo e córtex entorrinal, não encontramos relevâncias estatísticas no mtDNA para o marcador de dano 8OHdG, resultado contrário ao publicado por LOVELL et al. 2011.

Em relação ao nDNA, no hipocampo encontramos diferenças relevantes apenas na comparação entre o grupo DA e controles normais (Tabela 2). Diferenças entre DA e controles normais têm sido pouco relatadas na literatura analisando isoladamente nDNA em hipocampo.

No córtex entorrinal, nossos resultados demonstram claramente que os pacientes DA têm maior imunoreatividade, ou seja, maior dano oxidativo entre os três grupos, sendo essa diferença altamente relevante ($p_{S>N}=0,989$; $p_{S>A}=0,931$). Não encontramos nenhuma diferença estatisticamente significativa entre asDA e controles normais.

No córtex temporal, encontramos diferenças entre os grupos DA e controle em todas as sublocalizações celulares. Esses resultados estão de acordo com a literatura, que descreve melhor essa região em relação a esse marcador de dano. Apesar de não ser significativa, TE KOPPELE et al. (1996) encontraram aumento deste marcador em pacientes com DA. Da mesma forma, WANG et al. (2005) analisaram separadamente nDNA e mtDNA e encontraram aumento do marcador, porém também sem significância estatística. Em ambos os trabalhos, a ausência de significância pode estar relacionada com o método laboratorial e estatístico utilizado.

Além de aumento desse marcador, GABBITA et al. (1998) e NUNOMURA et al. (1999) encontram diferenças significantes entre DA e controles normais. Ainda, em ambas sublocalizações celulares encontramos diferenças relevantes entre os grupos asDA e DA, porém não houve diferença entre asDA e controles normais. Nossos resultados divergem de LOVELL et al. (2011), que demonstraram o aumento significativo desse marcador em asDA quando comparado com indivíduos normais, quantificado por espectrometria de massa.

Resumidamente, nossos resultados não demonstram diferenças entre os marcadores no hipocampo. Mais ainda, o córtex temporal é o local mais afetado por esse dano oxidativo que os outros estudados. Neste marcador, observamos que o grupo DA é o mais discrepante dos grupos, e que asDA, em nenhum tecido ou sublocalização celular, foi divergente do grupo normal.

A histona H2AX é um membro evolutivamente conservado da família de histonas H2A. Em resposta a quebras de dupla fita, esta histona é rapidamente fosforilada no resíduo Ser139 e Tyr142 da porção C-terminal por cinases da família PI3KK, como ATM, ATR e outras DNA-PKcs, dando origem à forma γ -H2AX (LOWNDES e TOH 2005; PINTO e FLAUS 2010). Com o objetivo de testar as diferenças em quebras de dupla fita entre os 3 grupos, utilizamos um anticorpo para o marcador fosforilado, ou seja, na forma γ H2AX.

No hipocampo, não encontramos diferenças relevantemente significantes, porém próximas ao nível de significância considerado ($p_{S>N}=0, 897$). É importante ressaltar que esses resultados concordam com os de 8OHdG, que também é um marcador de dano oxidativo de DNA.

No córtex entorrinal, encontramos diferenças significativas (Tabela 1) analisando os três grupos juntos pela análise bayesiana. Na análise par a par por meio das distribuições beta, encontramos diferenças relevantes para o grupo DA, que tem imunoreatividade maior que o grupo normal ($p_{S>N}=0,918$).

No córtex temporal, encontramos uma discreta diferença quando comparamos os 3 grupos ($p\text{-value}=0,09$) pela análise bayesiana. Observando a distribuição desse marcador, verificamos uma diferença relevante, onde o grupo DA tem maior imunoreatividade que o grupo normal ($p_{S>N}=0,993$) e que o grupo asDA ($p_{S>A}=0,963$). Até o presente momento, este é o primeiro trabalho que mostra diferenças de γ H2AX em neurônios de pacientes DA e asDA no córtex entorrinal e córtex temporal.

Há apenas dois trabalhos que mostram a marcação de γ -H2AX na DA. O primeiro trabalho demonstrou γ -H2AX aumentada em astrócitos de pacientes com a DA, em relação a indivíduos com envelhecimento normal (MYUNG et al. 2008). O trabalho mais recente não aponta nenhuma diferença desse marcador em astrócitos e neurônios relacionado com a progressão da DA (SIMPSON et al. 2010). Entretanto, a presença de danos ao DNA por quebra de simples/dupla fita foi extensivamente demonstrada aumentada na DA e, inclusive, em asDA (MULLAART et al. 1990; DRAGUNOW et al. 1995; LASSMANN et al. 1995; LUCASSEN et al. 1997; ANDERSON et al. 1996; SU et al. 1997; ADAMEC et al. 1999). O primeiro trabalho foi o de MULLAART et al. (1990), que mostrou no córtex frontal quebras de DNA duas vezes aumentada em DA. No mesmo ano, DRAGUNOW et al. (1995) e LASSMANN et al. (1995) demonstraram danos de DNA por quebra de fita (simples e dupla), através do ensaio ISEL (*in situ end labeling*), significativamente aumentada

em DA. ANDERSON et al. (1996) mostraram quebras de DNA por meio da marcação de deóxnuclitidil-transferase (*TdT-labeling*), e observaram um aumento significativo de quebras de DNA no córtex entorrinal de pacientes DA quando comparados com controles pareados pela idade. Em 1997, LUCASSEN et al. demonstraram com a mesma técnica, em hipocampo e em córtex entorrinal, mas não em córtex temporal. SU et al. (1997) demonstraram o aparecimento do dano oxidativo aumentado e anterior a formação de NFT no córtex visual de pacientes DA. ADAMEC et AL. (1999) demonstraram por 3 técnicas, ensaios de Tunel, Klenow e Apostain, a presença de quebras de dupla e simples fita em hipocampo de pacientes com Alzheimer e pacientes com NFT não dementados. Neste trabalho, os autores demonstram o incremento de quebras de DNA com a progressão da doença. Entretanto, dos trabalhos citados, apenas DRAGUNOW et al. (1995) e LASSMANN et al. (1995) LUCASSEN et al. (1997) e SU et al. (1997) analisaram neurônios. Nestes estudos, há uma discordância quanto ao córtex temporal. LUCASSEN et al. (1997) não acham nenhuma diferença e pouca marcação neste córtex em DA e normais. DRAGUNOW et al. e LASSMANN et al. (1995) encontraram tais diferenças, porém o primeiro trabalho compara apenas 3 pacientes com uma considerável variação de marcação, e sem uma técnica definida de fixação do tecido. O segundo trabalho demonstrou uma marcação de quebras de dupla fita 50 vezes maior em DA do que em controles, quando analisou 18 pacientes. Nosso trabalho concorda com estes, indicando um aumento de sinais de quebra de dupla fita nos córtices.

Alguns autores ponderaram que a presença de quebras de DNA por danos oxidativos poderia estar correlacionada com o intervalo *post-mortem* (PMI – *Post-*

mortem interval), porém nenhum dos autores demonstrou claramente esse efeito (LUCASSEN et al. 1995; DRAGUNOW et al. 1995; ANDERSON et al. 1996; LUCASSEN et al. 1997). As diferenças dos efeitos no PMI devem aparecer provavelmente depois de períodos relativamente longos, dependendo da área estudada. Não encontramos nenhuma diferença entre os grupos no PMI, assim como na idade. Ainda, nossos PMI não foram superiores a 30 horas, logo destacamos a possibilidade de interferência deste fator nos achados de danos de DNA.

O cérebro apresenta altos níveis de lipídios polinsaturados e, dessa forma, é suscetível a reação em cadeia de radicais livres da peroxidação de lipídios (HALLIWELL 1992). Há mais de 20 anos evidências indicam a possível participação da peroxidação de lipídios na patogênese da DA (SUBBARAO et al. 1990; BALAZS e LEON 1994; PALMER e BURNS 1994; LOVELL et al. 1995). Esse evento pode ser avaliado por métodos, incluindo a quantificação dos produtos finais de peroxidação como MDA (GREILBERGER et al. 2008).

Mais uma vez, não há diferenças significativas do dano oxidativos MDA no hipocampo, por nenhuma análise realizada no presente trabalho.

No córtex entorrinal observamos uma diferença relevantes na distribuição dos escores entre os DA e indivíduos normais e DA e asDA ($p_{S>N}=0,993$; $p_{S>A}=0,909$).

Nossos resultados demonstraram que apenas no córtex temporal os níveis de MDA apresentaram diferença estatisticamente significante, na comparação dos três grupos, através da estatística bayesiana. Nessa região, observamos um comportamento similar na distribuição dos escores entre asDA e indivíduos com envelhecimento normal. Pela distribuição beta, há uma clara distinção entre os pacientes DA em relação aos outros grupos ($p_{S>N}=0,999$; $p_{S>A}=0,979$).

A peroxidação lipídica vem sendo demonstrada alterada por meio das medidas de MDA em tecido cerebral e soro de pacientes com DA (LOVELL et al. 1995; BOURDEL-MARCHASSON et al. 2001; OZCANKAYA e DELIBAS 2002; AYBEK et al. 2007; MARTÍN-ARAGÓN et al. 2009), assim como em MCI (KELLER et al. 2005; BALDEIRAS et al. 2008; GREILBERGER et al. 2008; SEKLER et al. 2008; PADURARIU et al. 2010; TORRES et al. 2011; VENKATESHAPPA et al. 2012). Corroborando em parte com nossos resultados, LYRAS et al. (1997) não encontraram diferenças na peroxidação lipídica em hipocampo, assim como em córtex superior temporal. Diferente de nossos resultados, VENKATESHAPPA et al. (2012) analisaram a peroxidação lipídica, mensurando o MDA, em hipocampo, córtex frontal e cerebelo de pacientes DA e observaram alteração da peroxidação lipídica no hipocampo.

Conflitando com nossos resultados, recentemente pesquisadores não mostram diferenças nos subprodutos da peroxidação lipídica em hipocampo no grupo asDA em relação ao grupo normal (BRADLEY et al. 2010), assim como ALUISE et al. (2010) mostraram este mesmo marcador estatisticamente semelhante entre os grupos no lobo parietal.

Muitas evidências apontam o estresse oxidativo na patogênese da DA (BRADLEY et al. 2012; NUNOMURA et al. 2012; ZHU et al. 2012). Entretanto, a questão crucial é se o dano oxidativo contribui diretamente na patogênese. De uma forma geral, demonstramos aqui que os indivíduos asDA não têm diferenças de danos oxidativos dos indivíduos de envelhecimento normal. Mais ainda, não encontramos nenhuma diferença na evidência de dano oxidativo no hipocampo, local que esperávamos encontrar grandes diferenças relacionadas com a DA, uma vez que

é o sítio inicial da DA (BRAAK e BRAAK 1991). Uma possibilidade a ser explorada é que, durante o envelhecimento, os neurônios hipocampais de idosos normais e asDA acumulam tanto dano quanto os pacientes DA, entretanto são mais tolerantes a danos oxidativos e desenvolvem um mecanismo de resiliência, no qual mesmo acumulando danos não prejudicam a função cognitiva, por terem a possibilidade de criar novas sinapses, uma das bases do conceito conhecido como reserva cognitiva (STERN 2002, 2006; TUCKER e STERN 2011). Essa teoria está embasada com os achados de MECOCCHI et al. (1994), que demonstram o aumento de dano de DNA progredindo com a idade de indivíduos normais. Essa hipótese pode nos levar a crer que os insultos oxidativos no hipocampo podem não estar ligados à etiologia da DA, uma vez que essa doença é iniciada no hipocampo, onde, portanto, seriam mais provavelmente encontrados os danos oxidativos. Entretanto, no córtex não podemos afirmar o mesmo. Nossos resultados demonstram que, entre os três grupos, DA é o que tem maior quantidade de danos e o grupo que tem maiores diferenças em danos oxidativos. Dessa forma, podemos afirmar que danos oxidativos são uma característica da presença de demência da doença de Alzheimer.

6.2 REPARO DE DNA

ATM é uma proteína cinase membro da família fosfatidilinositol 3'-quinase (PI3K)-related kinase da família (PIKK) que desempenha um papel crítico na manutenção da integridade do genoma (ABRAHAM 2001; SHILOH 2003). As funções de ATM são garantir a integridade genômica por controle do ciclo celular, reparo de DNA e programação de apoptose em resposta aos danos de DNA (DERHEIMER e KASTAN 2010; BHATTI et al. 2011). ATM pode ativar proteínas de reparo como o complexo Rad50-Mre11-Nsb1, em resposta a quebras de dupla fita. Quando a maquinaria de reparo está sobrecarregada ou suprimida, ATM também pode ativar p53 e Chk1 para induzir parada no ciclo celular ou apoptose. Ainda, ATM é recrutado aos sítios de danos, onde, por um mecanismo de autofosforilação, aciona sua atividade de cinase para permitir a fosforilação de moléculas como a histona H2AX (BURMA et al. 2001; BAKKENIST e KASTAN 2003; FRIESNER et al. 2005; MATSUOKA et al. 2007), estudada no presente trabalho.

As medidas de expressão relativa mensuradas pela técnica de RT-qPCR não revelaram nenhuma diferença na expressão dos produtos gênicos. Diferente de nossos resultados, OLIVEIRA (2007) mostrou a diminuição dos produtos gênicos de ATM em 12 pacientes com DA.

O produto do gene ATM, medido por imunohistoquímica, de uma forma geral não teve marcação forte, diferente do esperado, uma vez que demonstramos quebra de dupla fita de DNA em todos os grupos. Ainda, a presença reduzida de ATM era esperada no grupo Alzheimer, uma vez que danos de DNA em pacientes têm sido largamente demonstrada na literatura por diferentes técnicas (MULLAART

et al. 1990; LASSMANN et al. 1995; LUCASSEN et al. 1997; ANDERSON et al. 1996; SU et al. 1997; ADAMEC et al. 1999) e a deficiência no reparo de DNA e biomoléculas era postulada como possível efeito patogênico da DA (ZHU et al. 2004, 2007).

Não houve nenhuma diferença entre os três grupos no hipocampo, córtex temporal. No córtex entorrinal, encontramos um evento isolado, que se trata da probabilidade relevante do grupo normal estar expressando maiores produtos do gene ATM que o grupo DA ($p_{S>N}=0,083$).

A presença de maiores níveis de ATM era esperada para os grupos não dementados, uma vez que, em nossa hipótese inicial, acreditávamos que o desbalanço de danos em biomoléculas, já mostrado relacionado com a clínica DA nos córtices, estaria relacionado a reparo de DNA. No caso de ATM, estes resultados são conflitantes com essa teoria, aparentando não ter nenhuma relação entre danos de DNA e a expressão desse gene.

Assim como ATM, um dos seus importantes alvos, o produto gênico de TP53, apresentou uma baixa imunoreatividade. Não encontramos nenhuma diferença entre os grupos na expressão do gene (RT-qPCR) e da proteína (imunohistoquímica) p53. As medidas de expressão por imunohistoquímica no hipocampo e córtices mostraram-se muito semelhantes entre os grupos e dentro dos grupos. Os valores de intensidade de marcação variaram de negativo a fraco. Diferentemente, DE LA MONTE et al. (1997) demonstraram aumento da imunoreatividade de p53 no lobo temporal em pacientes com DA, provavelmente ligado a apoptose, medidos por leitura densitométrica de western-blots. Entretanto, não conseguiram relacionar os achados de p53 com fragmentação de DNA apoptose-like, sendo provável que

apoptose não esteja diretamente envolvida com a expressão de p53 na doença de Alzheimer. As diferenças entre o trabalho de DE LA MONTE et al. (1997) e o presente estudo devem ser fruto das diferentes áreas e formas de análise. As imagens e medidas deste marcador foram realizadas através do equipamento Aperio ImageScopeTM v.10.2.2.2352 e analisadas por meio de um escore, que resulta em variáveis discretas, o que não permite observações na variabilidade do marcador.

Ainda assim, analisando o TP53 no hipocampo, por meio da técnica de RT-qPCR, não pudemos detectar uma possível variação entre os grupos, concordando com nossos resultados da imunohistoquímica para esse produto gênico. Mais ainda, um dos reguladores upstream de p53, ATM, também não foi encontrado diferencialmente expresso por nenhuma técnica realizada, no hipocampo. Entretanto, DE LA MONTE e WANDS (2006) mostraram aumento de p53 no córtex frontal em indivíduos no estágio Braak 4-5, mas não no estágio 6, comparados com indivíduos normais, estágio braak 0-1. É possível que haja uma relação íntima de p53 e DA. Alguns trabalhos demonstraram essa ligação de p53 com processos neurodegenerativos (UBERTI et al. 1998; MCGAHAN et al. 1998; CULMSEE et al. 2001; GILMAN et al. 2003; MORRISON et al. 2003) e com a própria DA (UBERTI et al. 2002, 2006; LANNI et al. 2007, 2008).

É importante ressaltar que ambos os trabalhos de UBERTI et al. (2002, 2006) e LANNI et al. (2008) não demonstram diferenças entre DA e controles quando analisam p53, mas demonstram um aumento de p53 com conformação alterada, por um mal desdobramento desta proteína (*protein misfolding*) causado por grandes quantidades de peptídeo a.

O PARP1 é uma proteína nuclear de 116 kDa e está envolvida em diversas processos celulares e moleculares como detecção de danos de DNA, regulação da transcrição, modificação da cromatina e regulação da maquinaria mitótica (CHAITANYA et al. 2010; STROSZNAJDER et al. 2012). No cérebro, essa proteína é responsável por mais de 90% das poli (ADP-ribosilações) (PIEPER et al. 2000; AMÉ et al. 2004). Essas funções são desempenhadas pela expressão nuclear de PARP1. Nossos resultados apontam uma baixa expressão nuclear da proteína PARP1, que pode estar relacionada à sobrevivência celular, uma vez que em altos níveis nucleares de PARP podem levar a depleção de NAD⁺, subsequentemente ATP, levando à insuficiência energética (KAUPPINEN et al. 2007), translocação da mitocôndria para o núcleo do fator indutor de apoptose (*apoptosis-inducing factor* - AIF) e subseqüente degradação de DNA e morte celular não mediada pela ativação de caspases (YU et al. 2002; KAUPPINEN et al. 2007).

Na comparação entre os grupos estudados, não mostramos diferenças relevantes no núcleo neuronal para o produto deste gene.

PARP1 é uma proteína *zinc-finger* de ligação ao DNA que participa de importantes vias de reparo como BER, quebras de simples e dupla fita (WOODHOUSE e DIANOV 2008; KRISHNAKUMAR e KRAUS 2010). Em resposta a danos oxidativos, recruta a maquinaria de reparo catalisando a transferência de ADP-ribose de NAD para porções de uma proteína alvo, que pode ser o a própria proteína PARP1, histonas, ou muitas outras proteínas, como por exemplo, ATM cinase, p53, topoisomerase I / II, GAPDH, e muitos fatores de transcrição (KRISHNAKUMAR e KRAUS 2010; STROSZNAJDER et al. 2012). Dessa forma, a inativação da PARP-1 leva a uma aceleração do envelhecimento do

cérebro, à redução do tempo de vida e aumento da carcinogênese, ou seja, eventos relacionados a ciclo celular que já vêm sendo fortemente demonstrados na DA (NAGY 2000; RAINA et al. 2004; COPANI et al. 2007, 2008; YANG e HERRUP 2007; HERRUP e YANG 2008; BONDA et al. 2010; FRANK e TSAI 2009; HERNÁNDEZ-ORTEGA et al. 2011; YUROV et al. 2011). Entretanto, assim como PARP1, ATM e p53, que são alvos deste gene, também não foram encontrados diferencialmente expressos, o que corrobora com a hipótese de que a maquinaria de reparo de DNA não sofre alterações com a DA.

Entretanto, o presente trabalho evidencia uma intensa imunoreatividade do produto do gene PARP1 expresso no citoplasma, também demonstrada discretamente no trabalho de LOVE et al. (1999). É importante salientar que nossos dados apontam um decréscimo da imunoreatividade de PARP1 no grupo de pacientes com a DA e de indivíduos normais. Observamos importantes diferenças entre os indivíduos asDA e os dois outros grupos, bem evidenciado no hipocampo ($p_{S>A}=0,007$; $p_{A>N}=0,985$). No córtex entorrinal PARP1 continua sendo mais expresso no grupo asDA, porém o grupo normal encontra-se com uma expressão semelhante a este, fazendo com que haja grande disparidade entre esses dois grupos e o grupo DA, que se mostra com uma baixa expressão ($p_{S>A}=0,018$; $p_{S>N}=0,026$). No córtex temporal, os indivíduos normais passam a ter maior expressão do que os grupos DA e asDA, que não exibem diferenças relevantes entre si ($p_{A>N}=0,098$; $p_{S>N}=0,050$).

Assim como em nossos resultados, COOKSON et al. (1999) também demonstraram uma marcação proeminente de PARP1 no citoplasma neuronal em tecido post mortem de três indivíduos neurologicamente saudáveis, indicando que PARP1 deve participar de uma via não canônica com uma atividade na célula

diferente da atividade desempenhada no núcleo, reparo de DNA. É importante notar que alguns estudos apresentaram evidências para a presença de PARP1 em mitocôndrias (SCOVASSI 2004; LAI et al. 2008; ROSSI et al. 2009). Sabe-se que PARP1 tem uma grande influência no metabolismo energético da célula por fazer uso de NAD⁺ como seu substrato ou ainda por regulação epigenética dos genes mitocondriais (LAPUCCI et al. 2011), e qualquer alteração em PARP1 pode levar ao prejuízo do metabolismo energético da célula (LAI et al. 2008). Tal fato explica nossos achados no córtex, mas não no hipocampo.

Em 2000 e 2005, um grupo de pesquisa israelita publicou a ativação de PARP1 na ausência de danos de DNA e após padrões de sinalização externa mediada por fosfolipases C (HOMBURG et al. 2000; VISOCHEK et al. 2005). Em 2007, o mesmo grupo demonstrou que a rápida ativação de PARP1 era mediada por ERK2, que opera dentro da via de sinalização ERK, mediando crescimento e diferenciação celular (COHEN-ARMON et al. 2007). Ainda, o mesmo trabalho demonstra a via ERK aumentando a expressão do gene c-fos, relacionado com a formação de memória (SNG et al. 2004; FARIOLI-VECCHIOLI et al. 2008; ALBERINI 2009). Ainda, já foi demonstrada a relação de PARP1 com atividades como plasticidade sináptica, memória, e envelhecimento (CHIARUGI e MOSKOWITZ 2003; SUNG e AMBRON 2004; BURKLE et al. 2005; HERNANDEZ et al. 2009; FONTÁN-LOZANO et al. 2010). HERNANDEZ et al. (2009) demonstraram que a ativação de PARP1 é necessária para a formação de memória em *Aplysia*. Similarmente, FONTÁN-LOZANO et al. (2010) demonstraram que a ativação de PARP1 é necessária para reconhecimento de objetos e no condicionamento do medo em camundongos.

Ainda, outras proteínas envolvidas com memória e plasticidade sináptica estão envolvidas com PARP1. A caspase 3 é uma importante proteína na morte celular programada em neurônios (TROY e SALVESEN 2002), mas também desempenha outras atividades como controle de processos biológicos, como plasticidade sináptica, migração e diferenciação (KUDRYASHOV et al. 2001, 2002; GULYAEVA et al. 2003). PARP1 é um dos substratos conhecidos da caspase 3. Quando PARP1 é clivado, resultam dois fragmentos, um com o domínio N-terminal de ligação de DNA, com 24kDa; e um segundo com o domínio catalítico C-terminal, com 89kDa. A clivagem de PARP1 já foi estabelecida como um dos principais indícios de apoptose, porém não é um evento necessário para a apoptose (WANG et al. 1997; DE MURCIA et al. 1997) e a relevância funcional neste processo é desconhecida. Entretanto, CHENG e ZOCHODNE (2003) demonstram a ausência de sinais de apoptose e o aumento de PARP1 e caspase 3 no citoplasma neuronal de camundongos com polineuropatia pela indução de diabetes por estreptozotocina, que também tem sido utilizado para induzir modelos animais de DA. Ainda, YUNG e SATOH (2001) demonstraram que o fragmento de 24kDa formado a partir da clivagem de PARP1 pela caspase 3, desempenha o mesmo papel nuclear de proteína inteira (116kDa - *full-length*) no reparo de danos, porém de forma mais lenta, competindo com a proteína *full-length* pelos *focis* de danos de DNA e, dessa forma, economizando substrato, e em última análise ATP.

É importante relatar que o anticorpo utilizado no presente trabalho é capaz de detectar a proteína completa de 116 kDa, assim como o produto da clivagem de 89kDa, que apresenta o domínio catalítico. Este domínio tem uma reduzida

atividade de ligação de DNA e é liberado do núcleo para o citoplasma, o que também pode explicar a proeminente marcação citoplasmática em nossos resultados.

Em última análise, estaríamos observando dois eventos importantes na tentativa de entendimento da possível função de PARP1 no hipocampo dos indivíduos asDA. A atividade aumentada de PARP1 no citoplasma deste grupo pode estar ligada não apenas a eventos de reparo, mas de plasticidade sináptica e memória pela interação com outras proteínas da via ERK, c-fos e caspase 3 no citoplasma de neurônios hipocampais (SNG et al. 2004; COHEN-ARMON et al. 2007; FARIOLI-VECCHIOLI et al. 2008; ALBERINI 2009); assim como a sobrevivência neuronal pela detecção do domínio catalítico 89kDa e a prevenção da insuficiência do metabolismo energético e morte por AIF. Assim, esse painel ratifica nossos resultados que demonstram os indivíduos asDA expressando maiores níveis dessa proteína no citoplasma neuronal no hipocampo.

O produto do gene PTEN é, geralmente, uma proteína citoplasmática que tem como principal função celular antagonizar a via de PI3K. PI3K gera fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato, que é crucial para a ativação da via AKT, mediadora de sobrevivência celular e pela ativação de substratos como GSK3 β (BRAZIL e HEMMINGS 2001).

Alguns estudos vêm demonstrando diferenças entre pacientes DA e indivíduos normais. GRIFFIN et al. (2005) foram dos primeiros autores a demonstrar diferenças desta proteína em cérebro de pacientes com DA. Esses autores demonstraram um decréscimo de imunoreatividade no núcleo de neurônios hipocampais e do córtex entorrinal e um aumento discreto em dendritos apicais de neurônios piramidais da região CA1. Da mesma forma, SONODA et al. (2010)

observaram um decréscimo de marcação citoplasmática em cérebros de pacientes com Alzheimer, em relação a marcação em cérebros de indivíduos com envelhecimento normal. Entretanto, outros autores não acharam nenhuma diferença na imunoreatividade nuclear no córtex temporal entre os pacientes DA e indivíduos normais (RICKLE et al. 2006). Diferindo destes trabalhos, demonstramos a expressão de PTEN no núcleo neuronal em hipocampo e os dois córtices estudados. Não observamos diferenças da expressão nuclear entre os grupos no hipocampo. Nos córtices entorrinal e temporal encontramos diferenças relevantes entre os pacientes com DA, em relação aos outros grupos, com exceção da comparação DA versus asDA, que tem uma probabilidade de diferença bem próxima ao threshold estabelecido ($p_{S>A}=0,873$).

Estudos sobre a localização de PTEN utilizando imunohistoquímica relataram sua presença no citoplasma; entretanto, esses estudos tinham como foco a proteína hiperexpressa ou em tecidos ou linhagens celulares tumorigênicas (FURNARI et al. 1997; LI e SUN 1997; WHANG et al. 1998). Subsequentemente, vários trabalhos demonstraram a presença de PTEN no núcleo de neurônios e células endoteliais (SANO et al. 1999), células mioepiteliais de dutos mamários (PERREN et al. 1999) e células normais da tireoide (GIMM et al. 2000). Em células neuronais o padrão de distribuição de PTEN tem sido mostrada em ambas as localizações celulares: nuclear e citoplasmática (SANO et al. 1999; LACHYANKAR et al. 2000). Nossos resultados mostram marcação nuclear em todos os grupos, DA; asDA e indivíduos normais (Figura 22).

No núcleo, a atividade lipídio fosfatase que regula a fosforilação de AKT e a expressão de p27 é diminuída, como demonstrado em células que expressam PTEN

com uma mutação que leva retenção da proteína no núcleo (CHUNG e ENG 2005). Entretanto, a atividade catalítica nuclear de PTEN é capaz de regular negativamente AKT nuclear, que, quando em atividade, é capaz de inativar FOXO3a e acelerar a progressão tumoral (TROTMAN et al. 2006, 2007). A atividade lipídio-fosfatase parece não ser desempenhada por PTEN nuclear, porém a exportação da proteína para o citoplasma depende da via de sinalização PI3K/AKT/mTOR, num sistema de feedback negativo (LIU et al. 2007), sendo, dessa forma, controlado pelos níveis de fosforilação de AKT. Se os níveis de fosforilação de AKT aumentam, PTEN é exportado para o citoplasma, inibindo a formação de PIP3 e, dessa forma, inibindo as vias a jusantes (*downstream*). Se AKT não é fosforilado, GSK3 β se mantém na forma ativa (TOWNSEND et al. 2007) e é descrito como responsável por eventos ligados a patologia de DA como a hiperfosforilação de Tau (LOVESTONE e REYNOLDS 1997; GAO et al. 2011). A partir de camundongos transgênicos desenvolvidos para hiperexpressar GSK3 β (AVILA et al. 2010), foram desenvolvidos knockout para tau com o intuito de testar o papel de GSK3 β no metabolismo de tau. O resultado indicou que o efeito tóxico da superexpressão de GSK3 β é mais suave e mais lento, na ausência de Tau (GÓMEZ DE BARREDA et al. 2010). Assim, é possível que o efeito do aumento de PTEN nuclear em asDA e DA observado nos nossos resultados seja um efeito protetor da patologia da doença, como já constatado anteriormente em pesquisas que relacionam o aumento da atividade em neurônios do hipocampo de pacientes DA (GRIFFIN et al. 2005; RICKLE et al. 2006) e diminuição de PTEN citoplasmático (GRIFFIN et al. 2005; KERR et al. 2006; SONODA et al. 2010).

Ainda, PTEN nuclear é capaz de regular a fosforilação de MAPK e os níveis de ciclina D1; mutantes que não expressam PTEN nuclear não são capazes de estabelecer esse controle. A inibição de ciclina D1 por PTEN leva a retenção do ciclo celular em G0-G1. Nossos resultados demonstram uma expressão constitutiva dessa proteína em todos os grupos (Figura 23), o que possivelmente seja resultado da observação de neurônios quiescentes. Entretanto, os maiores valores de expressão de PTEN nuclear ocorrem em pacientes DA. No hipocampo, a expressão de PTEN em pacientes DA e asDA é homogênea, como mostra o gráfico de distribuição (Figura 30). Dessa forma, acreditamos que esta função de PTEN de interagir com ciclina D1 pode estar regulando o ciclo celular das células em todos os grupos, porém não deve estar diretamente relacionada com a patogênese da DA, sendo provável a relação desta proteína com eventos ligados a estresse oxidativo e manutenção da estabilidade genômica, como já descrito anteriormente (TANG e ENG 2006; SHEN et al. 2007; CHENG et al. 2008).

Sob estresse oxidativo, PTEN se acumula no núcleo, podendo se ligar a p53 e amplificar as suas funções, dessa forma indicando que a atividade lipídio-fosfatase na presença de p53 é dispensável (FREEMAN et al. 2003; TANG e ENG 2006, CHENG et al. 2008). Esse fato corrobora com a ausência da atividade lipídio-fosfatase nas funções desempenhadas por PTEN no núcleo, e pode estar relacionado com nossos achados nos córtices. Entretanto, nossos resultados não demonstram nenhuma diferença por nenhuma técnica ou método de análise ou qualquer modificação na expressão de p53, onde observamos todos os grupos com variações mínimas na expressão desse supressor de tumor. Porém está claro que a proteína p53 tem uma meia-vida curta e seus níveis podem ser controlados por inibição de

degradação, o que pode dificultar a observação dessa proteína. Ainda a atividade nucleica de PTEN amplifica a função de p53 no núcleo (CHENG et al. 2008), podendo então abrandar a expressão desta proteína sem prejuízo na função.

O produto do gene RB (Retinoblastoma) é um gene supressor de tumor que tem um papel central no controle do ciclo celular (WEINBERG 1995). Na forma fosforilada, é um regulador negativo da progressão de ciclo celular. Na forma hiperfosforilada se desliga do complexo E2F1 o qual irá ativar genes necessários à progressão para a fase S (ANGUS e NEVINS 2012). Nossos resultados demonstram uma baixa expressão desse gene nos três grupos analisados, porém apresentando positividade. Esse resultado pode ser evidenciado nos resultados de RT-qPCR, onde demonstramos valores baixos de expressão relativa. Ainda, não observamos nenhuma diferença entre os grupos, em nenhum tecido analisado, na análise dos escores, evidenciado pelo FBST, assim como nenhuma diferença relevante na distribuição dos escores, evidenciados pelas distribuições beta. Uma vez que estamos analisando a proteína RB não fosforilada, é possível que os níveis basais da proteína sejam decorrentes da presença de RB ligada ao fator de transcrição E2F1, inibindo a progressão do ciclo celular nesses neurônios, que claramente ocorre em células quiescentes normais. Além da função de retenção do ciclo celular em G0-G1, Rb tem sido indicada a participar de outras funções celulares. O envolvimento de Rb na apoptose induzida por reentrada no ciclo celular (CLARKE et al. 1992; LEE et al. 1994; JACKS et al. 1992 YU et al. 2009, 2012), migração (CLARKE et al. 1992; FERGUSON et al. 2005), diferenciação (LEE et al. 1992, 1994; CHEN et al. 2007) e plasticidade de células precursoras (JORI et al. 2004). Além disso, Rb na forma fosforilada e ligado ao fator de transcrição E2F1, desempenha um papel fundamental

na parada do ciclo celular induzida por danos ao DNA, na regulação da transcrição de fatores envolvidos no reparo de DNA (HARRINGTON et al. 1998; BOSCO et al. 2004; INOUE et al. 2007). Como já demonstramos, a presença de danos ao DNA foi encontrada em todos os três grupos no presente trabalho. Era esperado que encontrássemos maiores respostas a danos de DNA e ainda com impedimento da progressão do ciclo celular em indivíduos normais, como o demonstrado pelo presente trabalho, em todos os sítios analisados. Intrigantemente, esperávamos também uma maior resposta destes danos e no ciclo celular em indivíduos com a ausência de sintomas clínicos – os asDA. Estes resultados podem estar demonstrando uma pouca influência de Rb nos danos de biomoléculas e no reparo de DNA na patogênese da DA.

Nenhum dos supressores de tumor foi encontrado diferencialmente expresso no hipocampo de paciente DA, asDA e indivíduos normais. É possível que a expressão destes marcadores esteja mascarada, uma vez que utilizamos para a extração do RNA espécimes de cérebro onde não pudemos separar os grupos celulares. Uma vez que CNS tem diferentes tipos de células que respondem diferentemente a mudanças no microambiente, o perfil expressão de uma fração do cérebro pode não expor a expressão de um grupo celular e assim pode não distinguir padrões de expressão (CAHOY et al. 2008; ZIU et al. 2011).

Um considerável número de evidências sugere um acúmulo de dano oxidativo de DNA, proteínas e lipídios, entretanto não se tem claro o quanto o dano é o evento primário ou secundário da patogênese da neurodegeneração. Neste trabalho, mostramos a presença de danos de DNA em todos os grupos analisados, possivelmente inerentes ao próprio envelhecimento (MECOCCI et al. 1994).

Importantemente, não achamos nenhuma alteração dos marcadores de dano de biomoléculas e produtos gênicos relacionados a reparo de DNA no hipocampo, que é local de início da neuropatologia de Alzheimer. É possível que, neste sítio, os danos de DNA sejam compensados por outros mecanismos não relacionados com reparo de DNA.

Diferentemente, no córtex, mostramos que o grupo DA é mais acometido por danos de biomoléculas e que este grupo difere amplamente dos demais grupos, asDA e normal. Não encontramos nenhuma diferença entre os grupos não dementados (asDA e normal), sendo possível que danos de DNA no córtex sejam um fator preponderante para o disparo dos déficits cognitivos da doença de Alzheimer. Diferente de nossa teoria inicial, não encontramos nenhum produto gênico de supressores de tumor, ou seja, sinalizadores e efetores de reparo de DNA alterado em nenhum grupo ou localização, com a exceção de PTEN, que pode estar envolvido na sinalização de danos no córtex. Entretanto, esse achado precisa ser melhor investigado, uma vez que PTEN foi encontrado fora da localização em que desempenha suas atividades, o citoplasma celular. Dessa forma, concluímos que reparo de DNA não está ligado nem a patologia, nem a clínica da doença de Alzheimer.

7 CONCLUSÃO

Não existe uma associação entre a presença de estresse oxidativo, através da análise de danos a biomoléculas, e atividade de genes supressores de tumor relacionados a danos em biomoléculas, em tecido *post-mortem* de indivíduos com a doença de Alzheimer e indivíduos idosos normais.

Não existe uma associação entre a presença de estresse oxidativo, através da análise de danos a biomoléculas, e atividade de genes supressores de tumor relacionados a danos em biomoléculas, em tecido *post-mortem* de grupos de indivíduos idosos com os achados patológicos da DA, diferenciados pela presença ou ausência da clínica.

No entanto, postulamos que os níveis de danos oxidativos sejam preponderantes para o disparo da demência.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abeti R, Abramov AY, Duchen MR. Beta-amyloid activates PARP causing astrocytic metabolic failure and neuronal death. **Brain** 2011; 134:1658-72.

Abraham RT. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. **Genes Dev** 2001; 15:2177-96.

Adamec E, Vonsattel JP, Nixon RA. DNA strand breaks in Alzheimer's disease. **Brain Res** 1999; 849:67-77.

Alberini CM. Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity. **Physiol Rev** 2009; 89:121-45.

Aluise CD, Robinson RA, Beckett TL, et al. Preclinical Alzheimer disease: brain oxidative stress, Abeta peptide and proteomics. **Neurobiol Dis** 2010; 39:221-8.

Alzheimer's Association, Thies W, Bleiler L. Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimers Dement** 2011; 7:208-44.

Amé JC, Spenlehauer C, de Murcia G. The PARP super- family. **Bioessays** 2004; 26:882-93.

Andjelkovic M, Alessi DR, Meier R, et al. Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. **J Biol Chem** 1997; 272:31515-24.

Anderson AJ, Su JH, Cotman CW. DNA damage and apoptosis in Alzheimer's disease: colocalization with c-Jun immunoreactivity, relationship to brain area, and effect of postmortem delay. **J Neurosci** 1996; 16:1710-9.

Angus SP, Nevins JR. A role for Mediator complex subunit MED13L in Rb/E2F-induced growth arrest. **Oncogene** 2012 [Epub ahead of print]

Arendt T, Rödel L, Gärtner U, Holzer M. Expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 in Alzheimer's disease. **Neuroreport** 1996; 7:3047-9.

Arendt T, Brückner MK, Mosch B, Lösche A. Selective cell death of hyperploid neurons in Alzheimer's disease. **Am J Pathol** 2010; 177:15-20.

Ashford JW. APOE genotype effects on Alzheimer's disease onset and epidemiology. **J Mol Neurosci** 2004; 23:157-65.

Avila J, Santa-Maria I, Perez M, Hernandez F, Moreno F. Tau phosphorylation, aggregation, and cell toxicity. **J Biomed Biotechnol** 2006; 2006:74539.

Avila J, Gómez de Barreda E, Engel T, et al. Tau kinase I overexpression induces dentate gyrus degeneration. **Neurodegener Dis** 2010; 7:13-5.

Aybek H, Ercan F, Aslan D, Sahiner T. Determination of malondialdehyde, reduced glutathione levels and APOE4 allele frequency in late-onset Alzheimer's disease in Denizli, Turkey. **Clin Biochem** 2007; 40:172-6.

Bakkenist CJ, Kastan MB. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. **Nature** 2003; 421:499–506.

Balazs L, Leon M. Evidence of an oxidative challenge in the Alzheimer's brain. **Neurochem Res** 1994; 19:1131-7.

Baldeiras I, Santana I, Proença MT, et al. Peripheral oxidative damage in mild cognitive impairment and mild Alzheimer's disease. **J Alzheimers Dis** 2008; 15:117-28

Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. **Physiol Rev** 1998; 78:547-81.

Bekris LM, Yu CE, Bird TD, Tsuang DW. Genetics of Alzheimer disease. **J Geriatr Psychiatry Neurol** 2010; 23:213-27.

Bennett DA, Schneider JA, Arvanitakis Z, et al. Neuropathology of older persons without cognitive impairment from two community-based studies. **Neurology** 2006; 66:1837-44.

Bertram L, Lill CM, Tanzi RE. The genetics of Alzheimer disease: back to the future. **Neuron** 2010; 68:270-81.

Beukelaers P, Vandenbosch R, Caron N, Nguyen L, Moonen G, Malgrange B. Cycling or not cycling: cell cycle regulatory molecules and adult neurogenesis. **Cell Mol Life Sci** 2012; 69:1493-503.

Bhatti S, Kozlov S, Farooqi AA, Naqi A, Lavin M, Khanna KK. ATM protein kinase: The linchpin of cellular defenses to stress. **Cell Mol Life Sci** 2011; 68:2977-3006.

Bihaqi SW, Schumacher A, Maloney B, Lahiri DK, Zawia NH. Do epigenetic pathways initiate late onset Alzheimer disease (LOAD): towards a new paradigm. **Curr Alzheimer Res** 2012; 9:574-88.

Blacker D, Haines JL, Rodes L, et al. ApoE-4 and age at onset of Alzheimer's disease: the NIMH genetics initiative. **Neurology** 1997; 48:139-47.

Boissonneault V, Plante I, Rivest S, Provost P. MicroRNA-298 and microRNA-328 regulate expression of mouse beta-amyloid precursor protein-converting enzyme 1. **J Biol Chem** 2009; 284:1971-81.

Bonda DJ, Bajić VP, Spremo-Potparevic B, et al. Review: cell cycle aberrations and neurodegeneration. **Neuropathol Appl Neurobiol** 2010; 36:157-63.

Bosco EE, Mayhew CN, Hennigan RF, Sage J, Jacks T, Knudsen ES. RB signaling prevents replication-dependent DNA double-strand breaks following genotoxic insult. **Nucleic Acids Res** 2004; 32:25-34.

Bosetti F, Brizzi F, Barogi S, et al. Cytochrome c oxidase and mitochondrial F1F0-ATPase (ATP synthase) activities in platelets and brain from patients with Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging** 2002; 23:371-6.

Bourdel-Marchasson I, Delmas-Beauvieux MC, Peuchant E, et al. Antioxidant defences and oxidative stress markers in erythrocytes and plasma from normally nourished elderly Alzheimer patients. **Age Ageing** 2001; 30:235-41.

Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. **Acta Neuropathol** 1991; 82:239-59.

Bradley MA, Markesbery WR, Lovell MA. Increased levels of 4-hydroxynonenal and acrolein in the brain in preclinical Alzheimer disease. **Free Radic Biol Med** 2010; 48:1570-6.

Bradley MA, Xiong-Fister S, Markesbery WR, Lovell MA. Elevated 4-hydroxyhexenal in Alzheimer's disease (AD) progression. **Neurobiol Aging** 2012; 33:1034-44.

Bradley WG, Polinsky RJ, Pendlebury WW, et al. DNA repair deficiency for alkylation damage in cells from Alzheimer's disease patients. **Prog Clin Biol Res** 1989; 317:715-32.

Brazil DP, Hemmings A. Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. **Trends Biochem Sci** 2001; 26:657-64.

Burkle A, Brabeck C, Diefenbach J, Beneke S. The emerging role of poly (ADP-ribose) polymerase-1 in longevity. **Int J Biochem Cell Biol** 2005; 37:1043-53.

Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. **J Biol Chem** 2001; 276:42462-7.

Butterfield DA, Poon HF, St Clair D, et al. Redox proteomics identification of oxidatively modified hippocampal proteins in mild cognitive impairment: insights into the development of Alzheimer's disease. **Neurobiol Dis** 2006a; 22:223-32.

Butterfield DA, Reed T, Perluigi M, et al. Elevated protein-bound levels of the lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-nonenal, in brain from persons with mild cognitive impairment. **Neurosci Lett** 2006b; 397:170-3.

Cahoy JD, Emery B, Kaushal A, et al. A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. **J Neurosci** 2008; 28:264-78.

Campos AH, Aldred VL, Ribeiro KC, Vassallo J, Soares FA. Role of immunoexpression of nitric oxide synthases by Hodgkin and Reed-Sternberg cells on apoptosis deregulation and on clinical outcome of classical Hodgkin lymphoma. **Mol Cell Biochem** 2009; 321:95-102.

Cardoso SM, Proença MT, Santos S, Santana I, Oliveira CR. Cytochrome c oxidase is decreased in Alzheimer's disease platelets. **Neurobiol Aging** 2004; 25:105-10.

Castellano JM, Kim J, Stewart FR, et al. Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid- β peptide clearance. **Sci Transl Med** 2011; 3:89ra57.

Cavallucci V, D'Amelio M, Cecconi F. A β toxicity in Alzheimer's disease. **Mol Neurobiol** 2012; 45:366-78.

Cecchi C, Fiorillo C, Sorbi S, et al. Oxidative stress and reduced antioxidant defenses in peripheral cells from familial Alzheimer's patients. **Free Radic Biol Med** 2002; 33:1372-9.

Chaitanya GV, Steven AJ, Babu PP. PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. **Cell Commun Signal** 2010; 8:31.

Chasseigneaux S, Dinc L, Rose C, et al. Secreted amyloid precursor protein beta and secreted amyloid precursor protein alpha induce axon outgrowth in vitro through Egr1 signaling pathway. **PLoS One** 2011; 6:e16301.

Chasseigneaux S, Allinquant B. Functions of A β , sAPP α and sAPP β : similarities and differences. **J Neurochem** 2012; 120(Suppl 1):99-108.

Chen F, David D, Ferrari A, Götz J. Posttranslational modifications of tau--role in human tauopathies and modeling in transgenic animals. **Curr Drug Targets** 2004; 5:503-15.

Chen D, Opavsky R, Pacal M, et al. Rb-mediated neuronal differentiation through cell-cycle-independent regulation of E2f3a. **PLoS Biol** 2007; 5:e179.

Cheng C, Zochodne DW. Sensory neurons with activated caspase-3 survive long-term experimental diabetes. **Diabetes** 2003; 52:2363-71.

Cheng CJ, Mulholland DJ, Valamehr B, Mosessian S, Sellers WR, Wu H. PTEN nuclear localization is regulated by oxidative stress and mediates p53-dependent tumor suppression. **Mol Cell Biol** 2008; 28:3281-9.

Chia JY, Gajewski JE, Xiao Y, Zhu HJ, Cheng HC. Unique biochemical properties of the protein tyrosine phosphatase activity of PTEN--demonstration of different active site structural requirements for phosphopeptide and phospholipid phosphatase activities of PTEN. **Biochim Biophys Acta** 2010; 1804:1785-95.

Chiarugi A, Moskowitz MA. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 activity promotes NF-kappaB-driven transcription and microglial activation: implication for neurodegenerative disorders. **J Neurochem** 2003; 85:306-17.

Chung JH, Eng C. Nuclear-cytoplasmic partitioning of phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN) differentially regulates the cell cycle and apoptosis. **Cancer Res** 2005; 65:8096-100.

Chouliaras L, Rutten BP, Kenis G, et al. Epigenetic regulation in the pathophysiology of Alzheimer's disease. **Prog Neurobiol** 2010; 90:498-510.

Cipriani G, Dolciotti C, Picchi L, Bonuccelli U. Alzheimer and his disease: a brief history. **Neurol Sci** 2011; 32:275-9.

Clarke AR, Maandag ER, van Roon M, van der Lugt NM, van der Valk M, Hooper ML, Berns A, te Riele H. Requirement for a functional Rb-1 gene in murine development. **Nature** 1992; 359:328-30.

Cleaver JE. γ H2Ax: biomarker of damage or functional participant in DNA repair “all that glitters is not gold!”. **Photochem Photobiol** 2011; 87:1230-9.

Cogswell JP, Ward J, Taylor IA, et al. Identification of miRNA changes in Alzheimer's disease brain and CSF yields putative biomarkers and insights into disease pathways. **J Alzheimers Dis** 2008; 14:27-41.

Cohen-Armon M, Visochek L, Rozensal D, et al. DNA-independent PARP-1 activation by phosphorylated ERK2 increases Elk1 activity: a link to histone acetylation. **Mol Cell** 2007; 25:297-308.

Cookson MR, Ince PG, Usher PA, Shaw PJ. Poly(ADP-ribose) polymerase is found in both the nucleus and cytoplasm of human CNS neurons. **Brain Res** 1999; 834:182-5.

Copani A, Caraci F, Hoozemans JJ, Calafiore M, Sortino MA, Nicoletti F. The nature of the cell cycle in neurons: focus on a "non-canonical" pathway of DNA replication causally related to death. **Biochim Biophys Acta** 2007; 1772:409-12.

Copani A, Guccione S, Giurato L, et al. The cell cycle molecules behind neurodegeneration in Alzheimer's disease: perspectives for drug development. **Curr Med Chem** 2008; 15:2420-32.

Coppedè F, Migliore L. DNA damage and repair in Alzheimer's disease. **Curr Alzheimer Res** 2009; 6:36-47.

Culmsee C, Zhu X, Yu QS, et al. A synthetic inhibitor of p53 protects neurons against death induced by ischemic and excitotoxic insults, and amyloid beta-peptide. **J Neurochem** 2001; 77:220-8.

Currais A, Hortobágyi T, Soriano S. The neuronal cell cycle as a mechanism of pathogenesis in Alzheimer's disease. **Aging (Albany NY)** 2009; 1:363-71.

Curti D, Rognoni F, Gasparini L, et al. Oxidative metabolism in cultured fibroblasts derived from sporadic Alzheimer's disease (AD) patients. **Neurosci Lett** 1997; 236:13-6.

Davis RE, Miller S, Herrstadt C, et al. Mutations in mitochondrial cytochrome c oxidase genes segregate with late-onset Alzheimer disease. **Proc Natl Acad Sci USA** 1997; 94:4526-31.

Day JJ, Sweatt JD. Epigenetic mechanisms in cognition. **Neuron** 2011; 70:813-29.

de La Monte SM, Sohn YK, Wands JR. Correlates of p53- and Fas (CD95)-mediated apoptosis in Alzheimer's disease. **J Neurol Sci** 1997; 152:73-83.

de La Monte SM, Wands JR. Molecular indices of oxidative stress and mitochondrial dysfunction occur early and often progress with severity of Alzheimer's disease. **J Alzheimers Dis** 2006; 9:167-81.

de Murcia JM, Niedergang C, Trucco C, et al. Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1997; 94:7303-7.

Derheimer FA, Kastan MB. Multiple roles of ATM in monitoring and maintaining DNA integrity. **FEBS Lett** 2010; 584:3675-81.

Ding Q, Markesbery WR, Cekarini V, Keller JN. Decreased RNA, and increased RNA oxidation, in ribosomes from early Alzheimer's disease. **Neurochem Res** 2006; 31:705-10.

Diniz M, Pereira CAB, Polpo A, Stern JM, Wechsler S. Relationship between Bayesian and frequentist significance indices. **Int J Uncertainty Quantification** 2012; 2:161-72.

Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. **Free Rad Biol Med** 2002; 32:1102-15.

Dorszewska J, Florczak J, Rózycka A, Jaroszevska-Kolecka J, Trzeciak WH, Kozubski W. Polymorphisms of the CHRNA4 gene encoding the alpha4 subunit of nicotinic acetylcholine receptor as related to the oxidative DNA damage and the level of apoptotic proteins in lymphocytes of the patients with Alzheimer's disease. **DNA Cell Biol** 2005; 24:786-94.

Dorszewska J, Kempisty B, Jaroszevska-Kolecka J, et al. Expression and polymorphisms of gene 8-oxoguanine glycosylase 1 and the level of oxidative DNA damage in peripheral blood lymphocytes of patients with Alzheimer's disease. **DNA Cell Biol** 2009; 28:579-88.

Dragunow M, Faull RL, Lawlor P, et al. *in situ* evidence for DNA fragmentation in Huntington's disease striatum and Alzheimer's disease temporal lobes. **Neuroreport** 1995; 6:1053-7.

Driscoll I, Troncoso J. Asymptomatic Alzheimer's disease: a prodrome or a state of resilience? **Curr Alzheimer Res** 2011; 8:330-5.

Eilam R, Peter Y, Elson A, et al. Selective loss of dopaminergic nigro-striatal neurons in brains of *Atm*-deficient mice. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1998; 95:12653-6.

Eilam R, Peter Y, Groner Y, Segal M. Late degeneration of nigro-striatal neurons in *ATM*^{-/-} mice. **Neuroscience** 2003; 121:83-9.

Evans TA, Raina, AK, Delacourte A. et al. BRCA1 may modulate neuronal cell cycle re-entry in Alzheimer disease. **Int J Med Sci** 2007; 4:140-45.

Fang M, Wang J, Zhang X, et al. The miR-124 regulates the expression of BACE1/ β -secretase correlated with cell death in Alzheimer's disease. **Toxicol Lett** 2012; 209:94-105.

Farioli-Vecchioli S, Saraulli D, Costanzi M, et al. The timing of differentiation of adult hippocampal neurons is crucial for spatial memory. **PLoS Biol** 2008; 6:e24.

Ferguson KL, McClellan KA, Vanderluit JL, et al. A cell-autonomous requirement for the cell cycle regulatory protein, Rb, in neuronal migration. **EMBO J** 2005; 24:4381-91.

Fontán-Lozano A, Suárez-Pereira I, Horrillo A, del-Pozo-Martín Y, Hmadcha A, Carrión AM. Histone H1 poly[ADP]-ribosylation regulates the chromatin alterations required for learning consolidation. **J Neurosci** 2010; 30:13305-13.

Frank CL, Tsai LH. Alternative functions of core cell cycle regulators in neuronal migration, neuronal maturation, and synaptic plasticity. **Neuron** 2009; 62:312-26.

Fraser MM, Bayazitov IT, Zakharenko SS, Baker SJ. Phosphatase and tensin homolog, deleted on chromosome 10 deficiency in brain causes defects in synaptic structure, transmission and plasticity, and myelination abnormalities. **Neuroscience** 2008; 151:476-88.

Freeman DJ, Li AG, Wei G, et al. PTEN tumor suppressor regulates p53 protein levels and activity through phosphatase-dependent and -independent mechanisms. **Cancer Cell** 2003; 3:117-30.

Freude KK, Penjwini M, Davis JL, LaFerla FM, Blurton-Jones M. Soluble amyloid precursor protein induces rapid neural differentiation of human embryonic stem cells. **J Biol Chem** 2011; 286:24264-74.

Friesner JD, Liu B, Culligan K, Britt AB. Ionizing radiation-dependent gamma-H2AX focus formation requires ataxia telangiectasia mutated and ataxia telangiectasia mutated and Rad3-related. **Mol Biol Cell** 2005; 16:2566-76

Furnari FB, Lin H, Huang H S, Cavenee W K. Growth suppression of glioma cells by PTEN requires a functional phosphatase catalytic domain. **Proc Natl Acad Sci USA** 1997; 94:12479-84.

Gabbita SP, Lovell MA, Markesbery WR. Increased nuclear DNA oxidation in the brain in Alzheimer's disease. **J Neurochem** 1998; 71: 2034-40.

Gackowski D, Rozalski R, Siomek A, et al. Oxidative stress and oxidative DNA damage is characteristic for mixed Alzheimer disease/vascular dementia. **J Neurol Sci** 2008; 266:57-62.

Gao C, Hölscher C, Liu Y, Li L. GSK3: a key target for the development of novel treatments for type 2 diabetes mellitus and Alzheimer disease. **Rev Neurosci** 2011; 23:1-11.

Gatz M, Reynolds CA, Fratiglioni L, et al. Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. **Arch Gen Psychiatry** 2006; 63:168-74.

Geekiyana H, Chan C. MicroRNA-137/181c regulates serine palmitoyltransferase and in turn amyloid β , novel targets in sporadic Alzheimer's disease. **J Neurosci** 2011; 31:14820-30.

Genin E, Hannequin D, Wallon D, et al. APOE and Alzheimer disease: a major gene with semi-dominant inheritance. **Mol Psychiatry** 2011; 16:903-7.

Gilman CP, Chan SL, Guo Z, Zhu X, Greig N, Mattson MP. p53 is present in synapses where it mediates mitochondrial dysfunction and synaptic degeneration in response to DNA damage, and oxidative and excitotoxic insults. **Neuromol Med** 2003; 3:159-72.

Gimm O, Perren A, Weng L P, et al. Differential nuclear and cytoplasmic expression of PTEN in normal thyroid tissue, and benign and malignant epithelial thyroid tumors. **Am J Pathol** 2000; 156:1693-1700.

Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. **Biochem Biophys Res Commun** 1984; 122:1131-5.

Goate A, Hardy J. Twenty years of Alzheimer's disease-causing mutations. **J Neurochem** 2012; 120 (Suppl 1):3-8.

Godbolt AK, Cipolotti L, Watt H, Fox NC, Janssen JC, Rossor MN. The natural history of Alzheimer disease: a longitudinal pre-symptomatic and symptomatic study of a familial cohort. **Arch Neurol** 2004; 61:1743-48.

Goedert M, Spillantini MG. A century of Alzheimer's disease. **Science** 2006; 314:777-81.

Gómez de Barreda E, Pérez M, Gómez Ramos P, et al. Tau-knockout mice show reduced GSK3-induced hippocampal degeneration and learning deficits. **Neurobiol Dis** 2010; 37:622-9.

Greilberger J, Koidl C, Greilberger M, et al. Malondialdehyde, carbonyl proteins and albumin-disulphide as useful oxidative markers in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. **Free Radic Res** 2008; 42:633-8.

Griffin RJ, Moloney A, Kelliher M, et al. Activation of Akt/PKB, increased phosphorylation of Akt substrates and loss and altered distribution of Akt and PTEN are features of Alzheimer's disease pathology. **J Neurochem** 2005; 93:105-117.

Grinberg LT, Ferretti RE, Farfel JM, et al. Brain bank of the Brazilian aging brain study group - a milestone reached and more than 1,600 collected brains. **Cell Tissue Bank** 2007; 8:151-62.

Guenette S, Chang Y, Hiesberger T, et al. Essential roles for the FE65 amyloid precursor protein-interacting proteins in brain development. **EMBO J** 2006; 25:420-31.

Guo Z, Kozlov S, Lavin MF, Person MD, Paull TT. ATM activation by oxidative stress. **Science** 2010; 330:517-21.

Gulyaeva NV, Kudryashov IE, Kudryashova IV. Caspase activity is essential for long-term potentiation. **J Neurosci Res** 2003; 73:853-64.

Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **J Neurochem** 1992; 59:1609-23.

Halliwell B, Gutteridge JMC. **Free radicals in biology and medicine** .4th ed. New York: Oxford University Press Inc; 2007.

Hampton MB, Fadeel B, Orrenius S. Redox regulation of the caspases during apoptosis. **Ann N Y Acad Sci** 1998; 854:328-35.

Hardy J, Allsop D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. **Trends Pharmacol Sci** 1991; 12:383-8.

Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. **Science** 1992; 256:184-5.

Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. **Science** 2002; 297:353-6.

Harold D, Abraham R, Hollingworth P, et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. **Nat Genet** 2009; 41:1088-93.

Harrington EA, Bruce JL, Harlow E, Dyson N. pRB plays an essential role in cell cycle arrest induced by DNA damage. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1998; 95:11945-50.

Hartmann D, De Strooper B, Saftig P. Presenilin-1 deficiency leads to loss of Cajal-Retzius neurons and cortical dysplasia similar to human type 2 lissencephaly. **Curr Biol** 1999; 9:719-27.

Hayashi T, Shishido N, Nakayama K, et al. Lipid peroxidation and 4-hydroxy-2-nonenal formation by copper ion bound to amyloid-beta peptide. **Free Radic Biol Med** 2007; 43:1552-9.

Hébert SS, Horré K, Nicolaï L, et al. Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/beta-secretase expression. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2008; 105:6415-20.

Hermon M, Cairns N, Egly J-M, Fery A, Labudova O, Lubec G. Expression of DNA excision-repair-cross-complementing proteins p80 and p89 in brain of patients with Down Syndrome and Alzheimer's disease. **Neurosci Lett** 1998; 251:45-8.

Herms J, Anliker B, Heber S, et al. Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members. **EMBO J** 2004; 23:4106-15.

Hernandez AI, Wolk J, Hu JY, et al.: Poly-(ADP- ribose) polymerase-1 is necessary for long-term facilitation in *Aplysia*. **J Neurosci** 2009; 29:9553-62.

Hernández-Ortega K, Quiroz-Baez R, Arias C. Cell cycle reactivation in mature neurons: a link with brain plasticity, neuronal injury and neurodegenerative diseases? **Neurosci Bull** 2011; 27:185-96.

Herrera E Jr, Caramelli P, Silveira AS, Nitrini R. Epidemiologic survey of dementia in a community-dwelling Brazilian population. **Alzheimer Dis Assoc Disord** 2002; 16:103-8.

Herrup K, Neve R, Ackerman SL, Copani A. Divide and die: cell cycle events as triggers of nerve cell death. **J Neurosci** 2004; 24:9232-9.

Herrup K, Yang Y. Cell cycle regulation in the postmitotic neuron: oxymoron or new biology? **Nat Rev Neurosci** 2007; 8:368-78.

Herrup K. Reimagining Alzheimer's disease--an age-based hypothesis. **J Neurosci** 2010; 30:16755-62.

Holton JL, Ghiso J, Lashley T, et al. Regional distribution of amyloid-Bri deposition and its association with neurofibrillary degeneration in familial British dementia. **Am J Pathol** 2001; 158:515-26.

Holton JL, Lashley T, Ghiso J, et al. Familial Danish dementia: a novel form of cerebral amyloidosis associated with deposition of both amyloid-Dan and amyloid-beta. **J Neuropathol Exp Neurol** 2002; 61:254-67.

Homburg S, Visochek L, Moran N, et al. A fast signal-induced activation of Poly(ADP-ribose) polymerase: a novel downstream target of phospholipase C. **J Cell Biol** 2000; 150:293-307.

Hung LW, Ciccotosto GD Giannakis, E. et al. Amyloid-beta peptide (Abeta) neurotoxicity is modulated by the rate of peptide aggregation: Abeta dimers and trimers correlate with neurotoxicity. **J Neurosci** 2008; 28:11950-8.

Inoue Y, Kitagawa M, Taya Y. Phosphorylation of pRB at Ser612 by Chk1/2 leads to a complex between pRB and E2F-1 after DNA damage. **EMBO J** 2007; 26:2083-93.

Iourov IY, Vorsanova SG, Liehr T, Yurov YB. Aneuploidy in the normal, Alzheimer's disease and ataxia-telangiectasia brain: differential expression and pathological meaning. **Neurobiol Dis** 2009; 34:212-20.

Iourov IY, Vorsanova SG, Yurov YB. Genomic landscape of the Alzheimer's disease brain: chromosome instability--aneuploidy, but not tetraploidy--mediates neurodegeneration. **Neurodegener Dis** 2011; 8:35-7.

Isella V, Villa L, Russo A, Regazzoni R, Ferrarese C, Appollonio IM. Discriminative and predictive power of an informant report in mild cognitive impairment. **J Neurol Neurosurg Psychiatr** 2006; 77:166-71.

Jacks T, Fazeli A, Schmitt EM, Bronson RT, Goodell MA, Weinberg RA. Effects of an Rb mutation in the mouse. **Nature** 1992; 359:295-300.

Jacobsen E, Beach T, Shen Y, Li R, Chang Y. Deficiency of the Mre11 DNA repair complex in Alzheimer's disease brains. **Brain Res Mol Brain Res** 2004; 128:1-7.

Jicha GA, Bowser R, Kazam IG, Davies P. Alz-50 and MC-1, a new monoclonal antibody raised to paired helical filaments, recognize conformational epitopes on recombinant tau. **J Neurosci Res** 1997; 48:128-32.

Jori FP, Napolitano MA, Melone MA, Cipollaro M, Cascino A, Giordano A, Galderisi U. Role of RB and RB2/P130 genes in marrow stromal stem cells plasticity. **J Cell Physiol** 2004; 200:201-12.

Jun G, Naj AC, Beecham GW, et al. Meta-analysis confirms CR1, CLU, and PICALM as Alzheimer disease risk loci and reveals interactions with APOE genotypes. **Arch Neurol** 2010; 67:1473-84.

Kauppinen TM. Multiple roles for poly (ADP-ribose) polymerase-1 in neurological disease. **Neurochem Int** 2007; 50:954-8.

Keller JN, Schmitt FA, Scheff SW, Ding Q, Chen Q, Butterfield DA, Markesbery WR. Evidence of increased oxidative damage in subjects with mild cognitive impairment. **Neurology** 2005; 64:1152-6.

[KEGG] Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. **Kegg pathway**. Available from: <URL:<http://www.genome.jp/kegg>> [2012 jan 12]

Kerr F, Rickle A, Nayeem N, Brandner S, Cowburn RF, Lovestone S. PTEN, a negative regulator of PI3 kinase signalling, alters tau phosphorylation in cells by mechanisms independent of GSK-3. **FEBS Lett** 2006; 580:3121-8.

Khachaturian AS, Corcoran CD, Mayer LS, Zandi PP, Breitner JC. Apolipoprotein E epsilon4 count affects age at onset of Alzheimer disease, but not lifetime susceptibility: The Cache County Study. **Arch Gen Psychiatry** 2004; 61:518-24.

Khan SM, Cassarino DS, Abramova NN, et al. Alzheimer's disease cybrids replicate beta-amyloid abnormalities through cell death pathways. **Ann Neurol** 2000; 48:148-55.

Kim WY, Shen J. Presenilins are required for maintenance of neural stem cells in the developing brain. **Mol Neurodegener** 2008; 3:2

Kitamura Y, Shimohama S, Kamoshima W, Matsuoka Y, Nomura Y, Taniguchi T. Changes of p53 in the brains of patients with Alzheimer's disease. **Biochem Biophys Res Commun** 1997; 232:418-21.

Kopke E, Tung YC, Shaikh S, Alonso AC, Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Microtubule-associated protein tau abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease. **J Biol Chem** 1993; 268:24374-84.

Krantic S, Mechawar N, Reix S, Quirion R. Molecular basis of programmed cell death involved in neurodegeneration. **Trends Neurosci** 2005; 28:670-6.

Krishnakumar R, Kraus WL. The PARP side of the nucleus: molecular actions, physiological outcomes, and clinical targets. **Mol Cell** 2010; 39:8-24

Kudryashov IE, Onufriev MV, Kudryashova IV, Gulyaeva NV. Periods of postnatal maturation of hippocampus: synaptic modifications and neuronal disconnection. **Brain Res Dev Brain Res** 2001; 132:113-20.

Kudryashov IE, Yakovlev AA, Kudryashova I, Gulyaeva NV. Foot-shock stress alters early postnatal development of electrophysiological responses and caspase-3 activity in rat hippocampus. **Neurosci Lett** 2002; 332:95-8.

Lachyankar MB Sultana, N Schonhoff CM et al. A role for nuclear PTEN in neuronal differentiation. **J Neuroscience** 2000; 20:1404-13.

Lanni C, Racchi M, Mazzini G, et al. Conformationally altered p53: a novel Alzheimer's disease marker? **Mol Psychiatry** 2008; 13:641-7.

Lanni C, Uberti D, Racchi M, Govoni S, Memo M. Unfolded p53: a potential biomarker for Alzheimer's disease. **J Alzheimers Dis** 2007; 12:93-9.

Lai Y, Chen Y, Watkins SC, et al. Identification of poly-ADP-ribosylated mitochondrial proteins after traumatic brain injury. **J Neurochem** 2008; 104:1700-11

Lapucci A, Pittelli M, Rapizzi E, Felici R, Moroni F, Chiarugi A. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 is a nuclear epigenetic regulator of mitochondrial DNA repair and transcription. **Mol Pharmacol** 2011; 79:932-40.

Lassmann H, Bancher C, Breitschopf H, Wegiel J, Bobinski M, Jellinger K, Wisniewski HM. Cell death in Alzheimer's disease evaluated by DNA fragmentation in situ. **Acta Neuropathol** 1995; 89:35-41.

Lauretto MS, Nakano F, Faria SR Jr, Pereira CA, Stern JM. A straight forward multiallelic significance test for the Hardy-Weinberg equilibrium law. **Genet Mol Biol** 2009; 32:619-25.

Lee EY, Chang CY, Hu N, Wang YC, Lai CC, Herrup K, Lee WH, Bradley A. Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis. **Nature** 1992; 359:288-94.

Lee EY, Hu N, Yuan SS, Cox LA, Bradley A, Lee WH, Herrup K. Dual roles of the retinoblastoma protein in cell cycle regulation and neuron differentiation. **Genes Dev** 1994; 8:2008-21.

Lee HG, Casadesus G, Zhu X, Joseph JA, Perry G, Smith MA. Perspectives on the amyloid-beta cascade hypothesis. **J Alzheimers Dis** 2004; 6:137-45.

Lee SH, Kim I, Chung BC. Increased urinary level of oxidized nucleosides in patients with mild-to-moderate Alzheimer's disease. **Clin Biochem** 2007; 40:936-8.

Lee Y, McKinnon PJ. Responding to DNA double strand breaks in the nervous system. **Neuroscience** 2007; 145:1365-74.

Leite F. **Envelhecimento populacional e a composição etária de beneficiários de planos de saúde.** [texto online]. 2011. Disponível em: <URL:<http://www.iess.org.br/TDIESS00422011EnvelhecimentoFE.pdf>>[2012 maio 12

Lesné S, Koh MT, Kotilinek L, et al. A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. **Nature** 2006; 440:352-7.

Lezi E, Swerdlow RH. Mitochondria in neurodegeneration. **Adv Exp Med Biol** 2012; 942:269-86.

Li DM, Sun H. TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta. **Cancer Res** 1997; 57:2124-29.

Li JC, Kaminskas E. Deficient repair of DNA lesions in Alzheimer's disease fibroblasts. **Biochem Biophys Res Commun** 1985; 129:733-8.

Li J, Yen C, Liaw D, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. **Science** 1997; 275:1943-7.

Liu JL, Mao Z, LaFortune TA, et al. Cell cycle-dependent nuclear export of phosphatase and tensin homologue tumor suppressor is regulated by the phosphoinositide-3-kinase signaling cascade. **Cancer Res** 2007; 67:11054-63.

Long JM, Lahiri DK. MicroRNA-101 downregulates Alzheimer's amyloid- β precursor protein levels in human cell cultures and is differentially expressed. **Biochem Biophys Res Commun** 2011; 404:889-95.

Lorenzo A, Yankner BA. Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1994; 91:12243-7.

Love S, Barber R, Wilcock GK. Increased poly (ADP-ribosyl) ation of nuclear proteins in Alzheimer's disease. **Brain** 1999; 122:247-53.

Lovell MA, Ehmann WD, Butler SM, Markesbury WR. Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease. **Neurology** 1995; 45:1594-601.

Lovell MA, Gabbita SP, Markesbury WR. Increased DNA oxidation and decreased levels of repair products in Alzheimer's disease ventricular CSF. **J Neurochem** 1999; 72:771-6.

Lovell MA, Xie C, Markesbury WR. Acrolein, a product of lipid peroxidation, inhibits glucose and glutamate uptake in primary neuronal cultures. **Free Radic Biol Med** 2000; 29:714-20.

Lovell MA, Xie C, Markesbury WR. Acrolein is increased in Alzheimer's disease brain and is toxic to primary hippocampal cultures. **Neurobiol Aging** 2001; 22:187-94.

Lovell MA, Markesbery WR. Oxidative DNA damage in mild cognitive impairment and late-stage Alzheimer's disease. **Nucleic Acids Res** 2007a; 35:7497-504.

Lovell MA, Markesbery WR. Oxidative damage in mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. **J Neurosci Res** 2007b; 85:3036-40.

Lovell MA, Soman S, Bradley MA. Oxidatively modified nucleic acids in preclinical Alzheimer's disease (PCAD) brain. **Mech Ageing Dev** 2011; 132:443-8.

Lovestone S, Reynolds CH. The phosphorylation of tau: a critical stage in neurodevelopment and neurodegenerative processes. **Neuroscience** 1997; 78:309-24.

Lowndes NF, Toh GW-L. DNA repair: The importance of phosphorylating histone H2AX. **Curr Biol** 2005; 15:R99-R102.

Lucassen PJ, Chung WC, Kamphorst W, Swaab DF. DNA damage distribution in the human brain as shown by in situ end labeling; area-specific differences in aging and Alzheimer disease in the absence of apoptotic morphology. **J Neuropathol Exp Neurol** 1997; 56:887-900.

Lucassen PJ, Chung WC, Vermeulen JP, et al. Microwave-enhanced in situ end-labeling of fragmented DNA: parametric studies in relation to postmortem delay and fixation of rat and human brain. **J Histochem Cytochem** 1995; 43:1163-71.

Lyras L, Cairns NJ, Jenner A, Jenner P, Halliwell B. An assessment of oxidative damage to proteins, lipids, and DNA in brain from patients with Alzheimer's disease. **J Neurochem** 1997; 68:2061-9.

Mancuso M, Filosto M, Bosetti F, et al. Decreased platelet cytochrome c oxidase activity is accompanied by increased blood lactate concentration during exercise in patients with Alzheimer disease. **Exp Neurol** 2003; 182:421-6.

Mantamadiotis T, Lemberger T, Bleckmann SC, et al. Disruption of CREB function in brain leads to neurodegeneration. **Nat Genet** 2002; 31:47-54.

Markesbery WR, Lovell MA. Four-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation, is increased in the brain in Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging** 1998; 19:33-6.

Markesbery WR, Kryscio RJ, Lovell MA, Morrow JD. Lipid peroxidation is an early event in the brain in amnesic mild cognitive impairment. **Ann Neurol** 2005; 58:730-5.

Martin LJ, Liu Z, Pipino J, Chestnut B, Landek MA. Molecular regulation of DNA damage-induced apoptosis of neurons in cerebral cortex. **Cereb Cortex** 2009; 19:1273-93.

Martín-Aragón S, Bermejo-Bescós P, Benedí J, et al. Metalloproteinase's activity and oxidative stress in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. **Neurochem Res** 2009; 34:373-8.

Martins RN, Harper CG, Stokes GB, et al. Increased cerebral glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in Alzheimer's disease may reflect oxidative stress. **J Neurochem** 1986; 46:1042-45.

Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. **Proc Natl Acad Sci USA** 1985; 82:4245-9.

Matsuoka S, Ballif BA, Smogorzewska A, et al. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. **Science** 2007; 316:1160-6.

McGahan L, Hakim AM, Robertson GS. Hippocampal Myc and p53 expression following transient global ischemia. **Brain Res Mol Brain Res** 1998; 56:133-45.

McGrath LT, McGleenon BM, Brennan S, McColl D, McILroy S, Passmore AP. Increased oxidative stress in Alzheimer's disease as assessed with 4-hydroxynonenal but not malondialdehyde. **QJM** 2001; 94:485-90.

Mead S, James-Galton M, Revesz T, et al. Familial British dementia with amyloid angiopathy: early clinical, neuropsychological and imaging findings. **Brain** 2000; 123:975-91.

Mecocci P, MacGarvey U, Beal MF. Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease. **Ann Neurol** 1994; 36:747-51.

Mecocci P, Polidori MC, Ingegneri T, et al. Oxidative damage to DNA in lymphocytes from AD patients. **Neurology** 1998; 51:1014-7.

Morrison RS, Kinoshita Y, Johnson MD, Guo W, Garden GA. p53- dependent cell death signaling in neurons. **Neurochem Res** 2003; 28:15–27.

Miners JS, Baig S, Palmer J, Palmer LE, Kehoe PG, Love S. Abeta-degrading enzymes in Alzheimer's disease. **Brain Pathol** 2008; 18:240-52.

Mirra SS, Heyman A, McKeel D, et al. The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. **Neurology** 1991; 41:479-86.

Moh C, Kubiak JZ, Bajic VP, Zhu X, Smith MA, Lee HG. Cell cycle deregulation in the neurons of Alzheimer's disease. **Results Probl Cell Differ** 2011; 53:565-76.

Moreira PI, Santos MS, Oliveira CR, et al. Alzheimer disease and the role of free radicals in the pathogenesis of the disease. **CNS Neurol Disord Drug Targets** 2008; 7:3-10.

Morris JC, McKeel DW Jr, Storandt M, et al. Verymild Alzheimer's disease: informant-based clinical, psychometric and pathologic distinction from normal aging. **Neurology** 1991; 41:469-78.

Morsch R, Simon W, Coleman PD. Neurons may live for decades with neurofibrillary tangles. **J Neuropathol Exp Neurol** 1999; 58:188-97.

Mosch B, Morawski M, Mittag A, Lenz D, Tarnok A, Arendt T. Aneuploidy and DNA Replication in the Normal Human Brain and Alzheimer's Disease. **J Neurosci** 2007; 27:6859-67.

Mullaart E, Boerrigter ME, Ravid R, Swaab DF, Vijg J. Increased levels of DNA breaks in cerebral cortex of Alzheimer's disease patients. **Neurobiol Aging** 1990; 11:169-73.

Myung NH, Zhu X, Kruman II, et al. Evidence of DNA damage in Alzheimer disease: phosphorylation of histone H2AX in astrocytes. **Age (Dordr)** 2008; 30:209-15.

Nagy Z. Cell cycle regulatory failure in neurones: causes and consequences. **Neurobiol Aging** 2000; 21:761-9.

Nakamura M, Shishido N, Nunomura A, et al. Three histidine residues of amyloid-beta peptide control the redox activity of copper and iron. **Biochemistry** 2007; 46:12737-43.

Nunomura A, Perry G, Pappolla MA, et al. RNA oxidation is a prominent feature of vulnerable neurons in Alzheimer's disease. **J Neurosci** 1999; 19:1959-64.

Nunomura A, Perry G, Aliev G, et al. Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. **J Neuropathol Exp Neurol** 2001; 60:759-67.

Nunomura A, Chiba S, Lippa CF, et al. Neuronal RNA oxidation is a prominent feature of familial Alzheimer's disease. **Neurobiol Dis** 2004; 17:108-13.

Nunomura A, Tamaoki T, Motohashi N, et al. The earliest stage of cognitive impairment in transition from normal aging to Alzheimer disease is marked by prominent RNA oxidation in vulnerable neurons. **J Neuropathol Exp Neurol** 2012; 71:233-41.

Oliveira DVNP. **Avaliação da expressão dos genes processadores de danos oxidativos em pacientes com Alzheimer**. Ribeirão Preto; 2007. [Dissertação de Mestrado-Universidade de São Paulo].

Ozcanakaya R, Delibas N. Malondialdehyde, superoxide dismutase, melatonin, iron, copper, and zinc blood concentrations in patients with Alzheimer disease: cross-sectional study. **Croat Med J** 2002; 43:28-32.

Padurariu M, Ciobica A, Hritcu L, Stoica B, Bild W, Stefanescu C. Changes of some oxidative stress markers in the serum of patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. **Neurosci Lett** 2010; 469:6-10.

Palmer AM, Bums MA. Selective increase in lipid peroxidation in the inferior temporal cortex in Alzheimer's disease. **Brain Res** 1994; 645:338-42.

Perren A, Weng L P, Boag A H, et al. Immunohistochemical evidence of loss of PTEN expression in primary ductal adenocarcinomas of the breast. **Am J Pathol** 1999; 155:1253-60.

Pei JJ, Tanaka T, Tung Y-C, Braak E, Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Distribution, levels and activity of glycogen synthase kinase-3 in the Alzheimer disease brain. **J Neuropathol Exp Neurol** 1997; 56:70-8.

Pei JJ, Braak E, Braak H, et al. Distribution of active glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β) in brains staged for Alzheimer disease neurofibrillary changes. **J Neuropathol Exp Neurol** 1999; 58:1010-9.

Pei JJ, Khatoon S, An WL, et al. Role of protein kinase B in Alzheimer's neurofibrillary pathology. **Acta Neuropathol** 2003; 105:381-92.

Pereira CAB, Nakano F, Stern JM, Whittle MR. Genuine Bayesian multiallelic significance test for the Hardy-Weinberg equilibrium law. **Genet Mol Res** 2006; 5:619-31.

Pereira CAB, Stern JM, Wechsler S. Can a significance test be a genuinely Bayesian? **Bayesian Anal** 2008; 3:79-100.

Pfaffl M. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res** 2001; 29:e45.

Pieper AA, Blackshaw S, Clements EE, et al. Poly(ADP-ribosyl)ation basally activated by DNA strand breaks reflects glutamate-nitric oxide neurotransmission. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2000; 97:1845-50.

Pinto DM, Flaus A. Structure and function of histone H2AX. **Subcell Biochem** 2010; 50:55-78.

Pocernich CB, Butterfield DA. Acrolein inhibits NADH-linked mitochondrial enzyme activity: implications for Alzheimer's disease. **Neurotox Res** 2003; 5:515-20.

Price JL, Morris JC. Tangles and plaques in nondemented aging and "preclinical" Alzheimer's disease. **Ann Neurol** 1995; 45:358-68.

Price JL, McKeel DW Jr, Buckles VD, et al. Neuropathology of nondemented aging: presumptive evidence for preclinical Alzheimer disease. **Neurobiol Aging** 2009; 30:1026-36.

Raina AK, Zhu X, Rottkamp CA, Monteiro M, Takeda A, Smith MA. Cyclin' toward dementia: cell cycle abnormalities and abortive oncogenesis in Alzheimer disease. **J Neurosci Res** 2000; 61:128-33.

Raina AK, Hochman A, Zhu X, et al. Abortive apoptosis in Alzheimer's disease. **Acta Neuropathol** 2001a; 101:305-10.

Raina AK, Zhu X, Monteiro M, Takeda A, Smith MA. Abortive oncogeny and cell cycle-mediated events in Alzheimer disease. **Prog Cell Cycle Res** 2001b; 4:235-42.

Raina AK, Zhu X, Smith MA. Alzheimer's disease and the cell cycle. **Acta Neurobiol Exp (Wars)** 2004; 64:107-12.

Revesz T, Holton JL, Lashley T, et al. Genetics and molecular pathogenesis of sporadic and hereditary cerebral amyloid angiopathies. **Acta Neuropathol** 2009; 118:115-30.

Rickle A, Bogdanovic N, Volkman I, et al. PTEN levels in Alzheimer's disease medial temporal cortex. **Neurochem Int** 2006; 48:114-23.

Robison SH, Munzer JS, Tandan R, Bradley WG. Alzheimer's disease cells exhibit defective repair of alkylating agent-induced DNA damage. **Ann Neurol** 1987; 21:250-8.

Rogaeva E, Meng Y, Lee JH, et al. The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease. **Nat Genet** 2007; 39:168-77.

Rossi MN, Carbone M, Mostocotto C, et al. Mitochondrial localization of PARP-1 requires interaction with mitofilin and is involved in the maintenance of mitochondrial DNA integrity. **J Biol Chem** 2009; 284:31616-24

Rozen S, Skaletsky HJ. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S, editors. **Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology**. Totowa, NJ: Humana Press; 2000. p.365-86.

Sano T, Lin H, Chen X, et al. Differential expression of MMAC/PTEN in glioblastoma multiforme: relationship to localization and prognosis. **Cancer Res** 1999; 59:1820-24.

Sayre LM, Zelasko DA, Harris PL, Perry G, Salomon RG, Smith MA. 4-Hydroxynonenal-derived advanced lipid peroxidation end products are increased in Alzheimer's disease. **J Neurochem** 1997; 68:2092-7.

Schmetsdorf S, Gärtner U, Arendt T. Constitutive expression of functionally active cyclin-dependent kinases and their binding partners suggests noncanonical functions of cell cycle regulators in differentiated neurons. **Cereb Cortex** 2007; 17:1821-9.

Schonrock N, Ke YD, Humphreys D, et al. Neuronal microRNA deregulation in response to Alzheimer's disease amyloid-beta. **PLoS One** 2010; 5:e11070.

Scovassi AI. Mitochondrial poly(ADP-ribosylation): from old data to new perspectives. **FASEB J** 2004; 18:1487-8

Sekler A, Jiménez JM, Rojo L, et al. Cognitive impairment and Alzheimer's disease: Links with oxidative stress and cholesterol metabolism. **Neuropsychiatr Dis Treat** 2008; 4:715-22.

Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genotypes, phenotypes, and treatments. **Science** 1997; 275:630-1.

Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. **Physiol Rev** 2001; 81:741-66.

Shan X, Tashiro H, Lin CL. The identification and characterization of oxidized RNAs in Alzheimer's disease. **J Neurosci** 2003; 23:4913-21.

Shankar GM, Li S, Mehta TH, et al. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. **Nat Med** 2008; 14:837-42.

Shao C, Xiong S, Li GM, et al. Altered 8-oxoguanine glycosylase in mild cognitive impairment and late-stage Alzheimer's disease brain. **Free Radic Biol Med** 2008; 45:813-9.

Shen WH, Balajee AS, Wang J, et al. Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity. **Cell** 2007; 128:157-70.

Shiloh Y ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. **Nat Cancer Rev** 2003; 3:155-68.

Simmons LK, May PC, Tomaselli KJ, et al. Secondary structure of amyloid beta peptide correlates with neurotoxic activity in vitro. **Mol Pharmacol** 1994; 45:373-9.

Simpson JE, Ince PG, Haynes LJ, et al. Population variation in oxidative stress and astrocyte DNA damage in relation to Alzheimer-type pathology in the ageing brain. **Neuropathol Appl Neurobiol** 2010; 36:25-40.

Smith MA, Casadesus G, Joseph JA, Perry G. Amyloid-beta and tau serve antioxidant functions in the aging and Alzheimer brain. **Free Radic Biol Med** 2002; 33:1194-9.

Sng JC, Taniura H, Yoneda Y. A tale of early response genes. **Biol Pharm Bull** 2004; 27:606-12.

Soini Y, Puhakka A, Kahlos K, et al. Endothelial nitric oxide synthase is strongly expressed in malignant mesothelioma but does not associate with vascular density or the expression of VEGF, FLK1 or FLT1. **Histopathology** 2001; 39:179-86.

Sonoda Y, Mukai H, Matsuo K, et al. Accumulation of tumor-suppressor PTEN in Alzheimer neurofibrillary tangles. **Neurosci Lett** 2010; 471:20-4.

Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, et al. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. **Alzheimers Dement** 2011; 7:280-92.

Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, et al. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. **Nat Genet** 1997; 15:356-62.

Stern Y. What is cognitive reserve? Theory and research application of the reserve concept. **J Int Neuropsychol Soc** 2002; 8:448-60.

Stern Y. Cognitive reserve and Alzheimer disease. **Alzheimer Dis Assoc Disord** 2006; 20:112-7.

Strosznajder JB, Czapski GA, Adameczyk A, Strosznajder RP. Poly (ADP-ribose) Polymerase-1 in Amyloid Beta Toxicity and Alzheimer's Disease. **Mol Neurobiol** 2012; 46:78-84.

Su JH, Deng G, Cotman CW. Neuronal DNA damage precedes tangle formation and is associated with up-regulation of nitrotyrosine in Alzheimer's disease brain. **Brain Res** 1997; 774:193-9.

Subbarao KV, Richardson JS, Ang LC. Autopsy samples of Alzheimer's cortex show increased peroxidation in vitro. **J Neurochem** 1990; 55:342-45.

Sultana R, Boyd-Kimball D, Poon HF, et al. Oxidative modification and down-regulation of Pin1 in Alzheimer's disease hippocampus: A redox proteomics analysis. **Neurobiol Aging** 2006; 27:918-25.

Sung YJ, Ambron RT. PolyADP-ribose polymerase-1 (PARP-1) and the evolution of learning and memory. **Bioessays** 2004; 26:1268-71.

Swerdlow RH, Khan SM. A "mitochondrial cascade hypothesis" for sporadic Alzheimer's disease. **Med Hypotheses** 2004; 63:8-20.

Swerdlow RH. Pathogenesis of Alzheimer's disease. **Clin Interv Aging** 2007; 2:347-59.

Swerdlow RH. Alzheimer's disease pathologic cascades: who comes first, what drives what. **Neurotox Res** 2012; 22:182-94.

Tamagno E, Bardini P, Obbili A, et al. Oxidative stress increases expression and activity of BACE in NT2 neurons. **Neurobiol Dis** 2002; 10:279-88.

Tamagno E, Parola M, Bardini P, et al. Beta-site APP cleaving enzyme up-regulation induced by 4-hydroxynonenal is mediated by stress-activated protein kinases pathways. **J Neurochem** 2005; 92:628-36.

Tanaka T, Nishiyama Y, Okada K, et al. Induction and nuclear translocation of thioredoxin by oxidative damage in the mouse kidney: independence of tubular necrosis and sulfhydryl depletion. **Lab Invest** 1997; 77:145-55.

Tang Y, Eng C. PTEN autoregulates its expression by stabilization of p53 in a phosphatase-independent manner. **Cancer Res** 2006; 66:736-42.

Te Koppele JM, Lucassen PJ, Sakkee AN, et al. 8OHdG levels in brain do not indicate oxidative DNA damage in Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging** 1996; 17:819-26.

Teunissen CE, de Vente J, Steinbusch HW, De Bruijn C. Biochemical markers related to Alzheimer's dementia in serum and cerebrospinal fluid. **Neurobiol Aging** 2002; 23:485-508.

Torres LL, Quaglio NB, de Souza GT, et al. Peripheral oxidative stress biomarkers in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. **J Alzheimers Dis** 2011; 26:59-68.

Toyokuni S, Tanaka T, Hattori Y, et al. Quantitative immunohistochemical determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by a monoclonal antibody N45.1: Its application to ferric nitrilotriacetate-induced renal carcinogenesis model. **Lab Invest** 1997; 76:365-74.

Townsend M, Mehta T, Selkoe DJ. Soluble A β inhib- its specific signal transduction cascades common to the insulin receptor pathway. **J Biol Chem** 2007; 282:33305-12.

Troncoso JC, Cataldo AM, Nixon RA, et al. Neuropathology of preclinical and clinical late-onset Alzheimer's disease. **Ann Neurol** 1998; 43:673-6.

Udvardy A. The role of controlled proteolysis in cell-cycle regulation. **Eur J Biochem** 1996; 240:307-13.

Trotman LC, Alimonti A, Scaglioni PP, Koutcher JA, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP. Identification of a tumour suppressor network opposing nuclear Akt function. **Nature** 2006; 441:523-7

Trotman LC, Wang X, Alimonti A, et al. Ubiquitination regulates PTEN nuclear import and tumor suppression. **Cell** 2007; 128:141-56.

Troy CM, Salvesen GS. Caspases on the brain. **J Neurosci Res** 2002; 69:145-50.

Tucker AM, Stern Y. Cognitive reserve in aging. **Curr Alzheimer Res** 2011; 8:354-60.

Uberti D, Belloni M, Grilli M, Spano P, Memo M. Induction of tumour-suppressor phosphoprotein p53 in the apoptosis of cultured rat cerebellar neurones triggered by excitatory amino acids. **Eur J Neurosci** 1998; 10:246–54.

Uberti D, Carsana T, Bernardi E, Rodella L, Grigolato P, Lanni C et al. Selective impairment of p53-mediated cell death in fibroblasts from sporadic Alzheimer's disease patients. **J Cell Sci** 2002; 115:3131-8.

Uberti D, Lanni C, Carsana T, et al. Identification of a mutant-like conformation of p53 in fibroblasts from sporadic Alzheimer's disease patients. **Neurobiol Aging** 2006; 27:1193-201.

Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): a critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. **J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev** 2009; 27:120-39.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol** 2002; 3:RESEARCH0034.

Venkateshappa C, Harish G, Mahadevan A, Srinivas Bharath MM, Shankar SK. Elevated Oxidative Stress and Decreased Antioxidant Function in the Human Hippocampus and Frontal Cortex with Increasing Age: Implications for Neurodegeneration in Alzheimer's Disease. **Neurochem Res** 2012; 37:1601-14.

Visochek L, Steingart RA, Vulih-Shultzman I, et al. PolyADP-ribosylation is involved in neurotrophic activity. **J Neurosci** 2005; 25:7420-8.

Vincent I, Rosado M, Davies P. Mitotic mechanisms in Alzheimer's disease? **J Cell Biol** 1996; 132:413-25.

[WHO] World Health Organization. ICD-10 classification of mental and behavioural disorders. Available from: <URL:http://www.who.int/substance_abuse/terminology/icd_10/en/index.html> [2012 maio 12]

Walsh DM, Selkoe DJ. Oligomers the brain: the emerging role of soluble protein aggregates in neurodegeneration. **Protein Pept Lett** 2004; 11:213-28.

Walsh DM, Selkoe DJ. A beta oligomers - a decade of discovery. **J Neurochem** 2007; 101:1172-84.

Wang H, Yu SW, Koh DW, et al. Apoptosis-inducing factor substitutes for caspase executioners in NMDA-triggered excitotoxic neuronal death. **J Neurosci** 2004; 24:10963-73.

Wang J, Xiong S, Xie C, Markesbery WR, Lovell MA. Increased oxidative damage in nuclear and mitochondrial DNA in Alzheimer's disease. **J Neurochem** 2005; 93:953-62.

Wang J, Markesbery WR, Lovell MA. Increased oxidative damage in nuclear and mitochondrial DNA in mild cognitive impairment. **J Neurochem** 2006; 96:825-32.

Wang WX, Rajeev BW, Stromberg AJ, et al. The expression of microRNA miR-107 decreases early in Alzheimer's disease and may accelerate disease progression through regulation of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1. **J Neurosci** 2008; 28:1213-23.

Wang ZQ, Stingl L, Morrison C, et al. PARP is important for genomic stability but dispensable in apoptosis. **Genes Dev** 1997; 11:2347-58.

Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. **Cell** 1995; 81:323-30.

Whang Y E, Wu X, Suzuki H, et al. Inactivation of the tumor suppressor PTEN/MMAC1 in advanced human prostate cancer through loss of expression. **Proc Natl Acad Sci USA** 1998; 95:5246-50.

Williams TI, Lynn BC, Markesbery WR, Lovell MA. Increased levels of 4-hydroxynonenal and acrolein, neurotoxic markers of lipid peroxidation, in the brain in Mild Cognitive Impairment and early Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging** 2006; 27:1094-9.

Woodhouse BC, Dianov GL. Poly ADP-ribose polymerase-1: an international molecule of mystery. **DNA Repair** 2008; 7:1077-86.

Yaari R, Corey-Bloom J. Alzheimer's disease. **Semin Neurol** 2007; 27:32-41.

Yang J, Xu ZP, Huang Y, Hamrick HE, Duerksen-Hughes PJ, Yu YN. ATM and ATR: sensing DNA damage. **World J Gastroenterol** 2004; 10:155-60.

Yang Y, Geldmacher DS, Herrup K. DNA replication precedes neuronal cell death in Alzheimer's disease. **J Neurosci** 2001; 21:2661-8.

Yang Y, Mufson EJ, Herrup K. Neuronal cell death is preceded by cell cycle events at all stages of Alzheimer's disease. **J Neurosci** 2003; 23:2557-63.

Yang Y, Herrup K. Loss of neuronal cell cycle control in ataxia-telangiectasia: a unified disease mechanism. **J Neurosci** 2005; 25:2522-9.

Yang Y, Varvel NH, Lamb BT, Herrup K. Ectopic cell cycle events link human Alzheimer's disease and amyloid precursor protein transgenic mouse models. **J Neurosci** 2006; 26:775-84.

Yang Y, Herrup K. Cell division in the CNS: protective response or lethal event in post-mitotic neurons? **Biochim Biophys Acta** 2007; 1772:457-66.

Yu SW, Wang H, Poitras MF, et al. Mediation of poly (ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. **Science** 2002; 297:259-63.

Yu Y, Ren QG, Zhang ZH, et al. Phospho-Rb mediating cell cycle reentry induces early apoptosis following oxygen-glucose deprivation in rat cortical neurons. **Neurochem Res** 2012; 37:503-11.

Yuan J, Yankner BA. Apoptosis in the nervous system. **Nature** 2000; 407:802-9.

Yung TM, Satoh MS. Functional competition between poly(ADP-ribose) polymerase and its 24-kDa apoptotic fragment in DNA repair and transcription. **J Biol Chem** 2001; 276:11279-86.

Yurov YB, Vorsanova SG, Iourov IY. The DNA replication stress hypothesis of Alzheimer's disease. **SciWorld J** 2011; 11:2602-12.

Zana M, Janka Z, Kálmán J. Oxidative stress: a bridge between Down's syndrome and Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging** 2007; 28:648-76.

Zhu X, Raina AK, Perry G, Smith MA. Alzheimer disease, the two-hit hypothesis. **Lancet Neurol** 2004; 3:219-26.

Zhu X, Lee HG, Perry G, Smith MA. Alzheimer disease, the two-hit hypothesis: an update. **Biochim Biophys Acta** 2007; 1772:494-502.

Zhu X, Castellani RJ, Moreira PI, et al. Hydroxynonenal-generated crosslinking fluorophore accumulation in Alzheimer disease reveals a dichotomy of protein turnover. **Free Radic Biol Med** 2012; 52:699-704.

Ziu M, Fletcher L, Rana S, Jimenez DF, Digicaylioglu M. Temporal differences in microRNA expression patterns in astrocytes and neurons after ischemic injury. **PLoS One** 2011; 6:e14724.