

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE MARCADORES
RELACIONADOS AO CICLO CELULAR E À MORTE
CELULAR ENTRE DOENÇA DE ALZHEIMER
SINTOMÁTICA E ASSINTOMÁTICA EM CÉREBROS
HUMANOS *POST-MORTEM***

ADERBAL RUY TEODORO DA SILVA

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

Área de concentração: Oncologia

Orientadora: Prof^ª Dra Helena Brentani

São Paulo

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Silva, Aderbal Ruy Teodoro da

Expressão diferencial de marcadores relacionados ao ciclo celular e à morte celular entre doença de Alzheimer sintomática e assintomática em cérebros humanos post-mortem / Aderbal Ruy Teodoro da Silva- São Paulo, 2013.

125p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientadora: Helena Brentani

Descritores: 1. DOENÇA DE ALZHEIMER. 2. CÉREBRO/patologia. 3. RESERVA COGNITIVA. 4. CICLO CELULAR 5. AUTÓPSIA. 6. TISSUE ARRAY ANALYSIS.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Diná e Aderbal e à minha irmã Tatiane, pelo apoio, admiração, compreensão e amor incondicional, fundamentais para a conclusão de mais essa etapa em minha vida.

À minha avó Djanira, cujas orações ajudaram a me fortalecer e continuar caminhando.

À minha orientadora Helena Brentani, exemplo do que é ser cientista, pela busca incessante do saber, do conhecimento.

AGRADECIMENTOS

- A Deus.
- À minha orientadora Helena Brentani, pela oportunidade oferecida, discussões científicas e compreensão; sobretudo, pela amizade e pelo convívio.
- À Dra. Dirce Maria Carraro e todos os integrantes do Laboratório de Genômica e Biologia Molecular do CIPE – Hospital A. C. Carmargo, pelo acolhimento, ajuda no desenvolvimento do projeto e pelas amizades.
- Ao Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A. C. Camargo, principalmente ao Dr. Hugo Froes, à Dra. Maria Dirlei Begnami, à Dra. Isabela Werneck, que me ajudaram, grandemente, na obtenção e análise dos dados; ao Dr. Rafael Malagoli, pela essencial ajuda no desenvolvimento metodológico desse trabalho; à Suely Nonogaki e ao José Ivanildo Neves, pela assistência técnica nos ensaios de imuno-histoquímica e FISH.
- A todos os integrantes do Banco de Encéfalos de Humanos da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em especial, ao Dr. José Marcelo Farfel, que disponibilizou as amostras de seu estudo para a execução desse projeto.
- Aos amigos e colegas que sempre me apoiaram, Thiago F. Saraiva, Priscila Negraes, Aline Simas Rodrigues, Cairo Atila, Philipe Douglas da Silva, Mariana Maschietto, Tonielle Lacerda, Marcos Prado, Eloisa Oliviere, Louise Danielle, Ana Paula Suenaga, Bianca Lisboa, Renato Puga, Ana Paula Hidalgo, Eduardo Abrantes, Tatiana Iafuso, Paulo Rafael. Em especial, à Ana Cecília Feio pelo companheirismo durante todo o doutorado. Aos amigos do café do CIPE, Deborah Mundin, Fernanda Fortes, Roberto Ferreira, Iara Buzzo e Hellen Kuasne pelos momentos hilários.
- À FAPESP pelo apoio financeiro.

RESUMO

Silva ART. **Expressão diferencial de marcadores relacionados ao ciclo celular e à morte celular entre doença de Alzheimer sintomática e assintomática em cérebros humanos *post-mortem***. São Paulo; 2013. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

A doença de Alzheimer (DA) é caracterizada por um declínio cognitivo progressivo associado ao acúmulo de peptídeo β -amilóide (placas neuríticas), proteína tau hiperfosforilada (emaranhados neurofibrilares), degeneração sináptica e morte neuronal no hipocampo e em outras regiões corticais. Vários estudos apontam uma reativação do ciclo celular em neurônios pós-mitóticos na DA, o que levaria à morte neuronal. Porém, ainda não existe um estudo que avalie marcadores do ciclo celular em indivíduos portadores da neuropatologia típica da DA, mas que não apresentem evidências de comprometimento cognitivo (DA assintomática). Diante disso, este trabalho pretende verificar se existe diferença entre indivíduos com DA sintomática, DA assintomática e indivíduos normais em relação a marcadores do ciclo celular e de morte celular. Nossos resultados mostram alterações significantes de marcadores do ciclo e morte celular nos indivíduos com DA sintomática comparados aos com DA assintomática e aos normais, enquanto que, entre os indivíduos com DA assintomática e sujeitos normais, não existem diferenças significativas. Este trabalho sugere associação entre o controle da maquinaria do ciclo celular nos neurônios pós-mitóticos, e a manutenção do status cognitivo normal.

SUMMARY

Silva ART. [*Differential expression of cell cycle and cell death markers between symptomatic and asymptomatic Alzheimer's disease in post-mortem human brains*]. São Paulo; 2013. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Alzheimer's disease (AD) is characterized by progressive cognitive decline associated with accumulation of amyloid- β peptide (neuritic plaques), hyperphosphorylated tau protein (neurofibrillary tangles), synaptic degeneration and neuronal death in the hippocampus and in other cortical regions. Several studies indicate a reactivation of the cell cycle in AD post-mitotic neurons, leading to neuronal death. However, studies evaluating cell cycle markers in patients with AD neuropathology, but with no evidence of cognitive impairment (asymptomatic AD) are lacking. Therefore, this study intends to investigate whether there are differences among subjects with symptomatic AD, asymptomatic AD and normal individuals in relation to cell cycle and cell death markers. Our results show significant changes in both cell cycle and cell death markers in subjects with symptomatic AD compared to asymptomatic AD and normal individuals, while between asymptomatic AD individuals and normal subjects, there were no significant differences. This study suggests an association between the control of cell cycle machinery in post-mitotic neurons, and maintenance of normal cognitive status.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema do processamento de APP.....	3
Figura 2	Progressão do ciclo celular.....	14
Figura 3	Córtex cerebral em desenvolvimento.....	17
Figura 4	Esquema mostrando a montagem do bloco de TMA e a lâmina para a análise.....	30
Figura 5	Lâmina de um corte do TMA com as amostras selecionadas.....	32
Figura 6	Aspectos morfológicos das células neuronais.....	35
Figura 7	Contagem de células neuronais utilizando o software ZEN lite.....	36
Figura 8	Esquema ilustrativo do método utilizado para a estimativa da quantidade de neurônios no córtex temporal (T), hipocampo (H) e córtex entorrinal (E).....	37
Figura 9	Detecção de apoptose baseada na técnica de TUNEL.....	39
Figura 10	Padrão de expressão nuclear do marcador Cdk4 no hipocampo de indivíduos com DA-CP (A), DA-P (B) e sujeitos normais (C) com os respectivos níveis de expressão (D).....	44
Figura 11	Padrão de expressão citoplasmática do marcador Cdk4 no hipocampo de indivíduos com DA-CP (A), DA-P (B) e sujeitos normais (C) com os respectivos níveis de expressão (D).....	45

Figura 12	Padrão de expressão nuclear do marcador ciclina D no hipocampo de indivíduos com DA-CP(A), DA-P (B) e sujeitos normais (C) com os respectivos níveis de expressão (D).....	48
Figura 13	Padrão de expressão citoplasmática do marcador ciclina D no hipocampo de indivíduos com DA-CP (A), DA-P (B) e sujeitos normais (C) com os respectivos níveis de expressão (D).....	49
Figura 14	Padrão de expressão nuclear do marcador Rb no hipocampo de indivíduos com DA-CP (A), DA-P (B) e sujeitos normais (C) com os respectivos níveis de expressão (D).....	52
Figura 15	Padrão de expressão citoplasmática do marcador Rb no hipocampo de indivíduos com DA-CP(A), DA-P (B) e sujeitos normais (C) com os respectivos níveis de expressão (D).....	53
Figura 16	Padrão de expressão nuclear do marcador fosfo-Rb no hipocampo de indivíduos com DA-CP(A), DA-P (B) e sujeitos normais (C) com os respectivos níveis de expressão (D).....	55
Figura 17	Padrão de expressão citoplasmática do marcador fosfo-Rb no hipocampo de indivíduos com DA-CP(A), DA-P (B) e sujeitos normais (C) com os respectivos níveis de expressão (D).....	56
Figura 18	Padrão de expressão nuclear do marcador E2F1 no hipocampo de indivíduos com DA-CP(A), DA-P (B) e sujeitos normais (C) com os respectivos níveis de expressão (D).....	59
Figura 19	Padrão de expressão citoplasmática do marcador E2F1 no hipocampo de indivíduos com DA-CP(A), DA-P (B) e sujeitos normais (C) com os respectivos níveis de expressão (D).....	60

Figura 20	Padrão de expressão nuclear do marcador Cdk1 no hipocampo de indivíduos com DA-CP(A), DA-P (B) e sujeitos normais (C) com os respectivos níveis de expressão (D).....	63
Figura 21	Padrão de expressão citoplasmática do marcador Cdk1 no hipocampo de indivíduos com DA-CP(A), DA-P (B) e sujeitos normais (C) com os respectivos níveis de expressão (D).....	64
Figura 22	Padrão de expressão nuclear do marcador ciclina B no hipocampo de indivíduos com DA-CP(A), DA-P (B) e sujeitos normais (C) com os respectivos níveis de expressão (D).....	67
Figura 23	Padrão de expressão citoplasmática do marcador ciclina B no hipocampo de indivíduos com DA-CP(A), DA-P (B) e sujeitos normais (C) com os respectivos níveis de expressão (D).....	68
Figura 24	Padrão de expressão nuclear do marcador p27 no hipocampo de indivíduos com DA-CP(A), DA-P (B) e sujeitos normais (C) com os respectivos níveis de expressão (D).....	71
Figura 25	Padrão de expressão citoplasmática do marcador p27 no hipocampo de indivíduos com DA-CP(A), DA-P (B) e sujeitos normais (C) com os respectivos níveis de expressão (D).....	72
Figura 26	Padrão de expressão nuclear do marcador Cdk5 no hipocampo de indivíduos com DA-CP(A), DA-P (B) e sujeitos normais (C) com os respectivos níveis de expressão (D).....	75
Figura 27	Padrão de expressão citoplasmática do marcador Cdk5 no hipocampo de indivíduos com DA-CP(A), DA-P (B) e sujeitos normais (C) com os respectivos níveis de expressão (D).....	76

Figura 28	Avaliação de morte celular no hipocampo de indivíduos com DA-CP(A), DA-P (B) e sujeitos normais (C) com os respectivos níveis de expressão (D).....	79
Figura 29	Clusterização hierárquica baseada nos valores de expressão de marcadores de ciclo e morte celular nos indivíduos DA-CP, DA-P e N.....	81
Figura 30	Imuno-FISH.....	83
Figura 31	Imuno-CISH.....	84
Figura 32	Modelo ilustrando o bloqueio de ciclo celular neuronal pela Cdk5.....	91

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Características das amostras selecionadas de acordo com os critérios clínicos e neuropatológicos.....	28
Quadro 2	Mapa da localização de cada amostra no TMA.....	31
Quadro 3	Anticorpos primários utilizados nas reações de imunohistoquímica....	34
Quadro 4	Sumário da avaliação dos marcadores do estudo no hipocampo.....	85
Tabela 1	Idade média dos indivíduos em cada grupo do estudo.....	42
Tabela 2	Distribuição de gêneros entre os grupos.....	42
Tabela 3	Estatística descritiva referente à expressão de Cdk4 no hipocampo.....	46
Tabela 4	Testes estatísticos para verificar significância da expressão de Cdk4 no hipocampo.....	46
Tabela 5	Estatística descritiva referente à expressão de ciclina D1 no hipocampo.....	50
Tabela 6	Testes estatísticos para verificar significância da expressão de ciclina D1 no hipocampo.....	50
Tabela 7	Estatística descritiva referente à expressão de Rb no hipocampo.....	54
Tabela 8	Testes estatísticos para verificar significância da expressão de Rb no hipocampo.....	54

Tabela 9	Estatística descritiva referente à expressão de Rb fosforilada no hipocampo.....	57
Tabela 10	Testes estatísticos para verificar significância da expressão de Rb fosforilada no hipocampo.....	57
Tabela 11	Estatística descritiva referente à expressão de E2F1 no hipocampo.....	61
Tabela 12	Testes estatísticos para verificar significância da expressão de E2F1 no hipocampo.....	61
Tabela 13	Estatística descritiva referente à expressão de Cdk1 no hipocampo.....	65
Tabela 14	Testes estatísticos para verificar significância da expressão de Cdk1 no hipocampo.....	65
Tabela 15	Estatística descritiva referente à expressão de ciclina B1 no hipocampo.....	69
Tabela 16	Testes estatísticos para verificar significância da expressão de ciclina B1 no hipocampo.....	69
Tabela 17	Estatística descritiva referente à expressão de p27 no hipocampo.....	73
Tabela 18	Testes estatísticos para verificar significância da expressão de p27 no hipocampo.....	73
Tabela 19	Estatística descritiva referente à expressão de Cdk5 no hipocampo.....	77
Tabela 20	Testes estatísticos para verificar significância da expressão de Cdk5 no hipocampo.....	77

Tabela 21 Estatística descritiva referente à morte celular no hipocampo..... 80

Tabela 22 Testes estatísticos para verificar significância de morte celular no hipocampo..... 80

LISTA DE SIGLAS

AICD	APP-intracellular domain
APA	American Psychiatric Association
APOE	Apolipoproteína E
APP	Amyloid Precursor Protein
ATP	Adenosina trifosfato
Aβ	Peptídeo β -amilóide
BACE	Beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme
BrdU	Bromodeoxiuridina
CCL	Comprometimento cognitivo leve
CDK	Cyclin-dependent kinase
CDR	Clinical Dementia Ratio
CERAD	Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease
CISH	Chromogenic <i>in situ</i> hybridization
CKI	Cyclin-dependent kinase inhibitor
CRC	Capacidade de reserva cerebral
DA	Doença de Alzheimer
DA-CP	Doença de Alzheimer clínico-patológica
DA-P	Doença de Alzheimer patológica/pré-clínica
DAF	Doença de Alzheimer familiar
DAIP	Doença de Alzheimer de início precoce
DAIT	Doença de Alzheimer de início tardio
DSM-IV	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders IV
E2F	Fator de transcrição E2F
ENF	Emaranhado neurofibrilar
FISH	Fluorescent <i>in situ</i> hybridization
FPM	Fator promotor da fase M
IHQ	Imuno-histoquímica
IMUNO-CISH	Imuno-histoquímica e Hibridização Cromogênica <i>in situ</i>
IMUNO-FISH	Imunofluorescência e Hibridização Fluorescente <i>in situ</i>

LCR	Líquido cefalorraquidiano
N	Envelhecimento normal
NIA-RI	National Institute of Aging e Reagan Institute
NINCDS-ADRDA	National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and Alzheimer's Disease and Related Disorders Association
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PD	Placa difusa
PHF	Paired helical filaments
PN	Placa neurítica
PS	Placa senil
PSEN1	Presenilina 1
PSEN2	Presenilina 2
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
Rb	Retinoblastoma
RC	Reserva cognitiva
sAPP-α	Soluble extracellular fragment APP alpha
sAPP-β	Soluble extracellular fragment APP beta
SNC	Sistema nervoso central
SORL1	Sortilina 1
SV40-T	Simian Vacuolating Virus 40 T Antigen
TMA	Tissue Microarray
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nickend labeling
ZSV	Zona subventricular
ZV	Zona ventricular

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Aspectos fundamentais da doença de Alzheimer.....	1
1.1.1	Placas Senis.....	2
1.1.2	Emaranhados neurofibrilares	4
1.1.3	Fatores genéticos associados à doença de Alzheimer.....	5
1.2	Critérios diagnósticos.....	8
1.2.1	Redefinindo os estágios iniciais da DA	9
1.3	Ciclo celular na DA.....	13
1.3.1	Regulação do ciclo celular	13
1.3.2	Ciclo celular em neurônios	16
1.3.3	Alterações do ciclo celular na DA	19
1.4	Justificativa	21
2	OBJETIVOS.....	22
2.1	Objetivo geral.....	22
2.2	Objetivos específicos	22
3	MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1	Casuística	23
3.1.1	Critérios de inclusão e exclusão.....	23
3.1.2	Avaliação clínica.....	25
3.1.3	Avaliação neuropatológica.....	26
3.1.4	Classificação das amostras baseada nos parâmetros clínicos e patológicos	27
3.2	Construção do tissue microarray (TMA)	29
3.3	Imuno-histoquímica (IHQ)	32
3.3.1	Marcadores de Imuno-histoquímica.....	32
3.3.2	Análise da IHQ.....	34
3.4	Avaliação de morte celular	39
3.5	Imunofluorescência e hibridização fluorescente <i>in situ</i> (IMUNO-FISH).....	40
3.6	Análise Estatística	41

4	RESULTADOS	42
4.1	Caracterização Das Amostras	42
4.2	Marcadores de ciclo celular	43
4.2.1	Cdk4	43
4.2.2	Ciclina D1	47
4.2.3	Rb	51
4.2.4	E2f1	58
4.2.5	Cdk1	62
4.2.6	Ciclina B1	65
4.2.7	p27 ^{Kip1}	70
4.2.8	Cdk5	74
4.3	Morte celular	78
4.3.1	Detecção de apoptose baseada na técnica de TUNEL	78
4.4	Clusterização hierárquica	81
4.5	Duplicação do material genético	82
4.5.1	Imuno-FISH	82
4.5.2	Imuno-CISH	83
4.6	Sumário dos resultados	85
5	DISCUSSÃO.....	87
5.1	Quinases dependentes de ciclina (CDKS)	88
5.2	Ciclinas.....	91
5.3	Inibidores de CDK	92
5.4	Proteína retinoblastoma.....	93
5.5	Replicação do DNA	95
5.6	Neuropatologia da doença de Alzheimer e re-entrada no ciclo celular	96
6	CONCLUSÕES.....	104
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	105

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS FUNDAMENTAIS DA DOENÇA DE ALZHEIMER

A doença de Alzheimer (DA) é a causa mais comum de demência em idosos, responsável por cerca de 70% das demências, isoladamente ou em conjunto com outras doenças (CUMMINGS e COLE 2002; HERRERA et al. 2002). A DA é clinicamente caracterizada pela progressiva deterioração de funções cognitivas, alterações de personalidade, sintomas psiquiátricos, evoluindo através de muitos anos até culminar, em fases mais avançadas, com a completa perda de autonomia, dependência funcional para todas as atividades diárias e óbito.

Em 1907, o médico alemão Alois Alzheimer forneceu a primeira descrição de uma doença de deterioração mental que levaria, mais tarde, seu nome. Alzheimer descreveu, no cérebro de uma mulher portadora de demência, achados patológicos clássicos como as placas senis (PS) e os emaranhados neurofibrilares (ENF). Desde então, durante as várias décadas seguintes, esforços científicos foram realizados na tentativa de definir a patogênese da doença. O primeiro avanço foi feito com a caracterização molecular das PSs e ENFs, quando o peptídeo amiloide- β foi identificado como o principal componente das PSs (GLENNER e WONG 1984; MASTERS et al. 1985) e tau como o principal componente dos ENFs (GRUNDKE-IQBAL et al. 1986a), ambos na década de 1980. Outras descobertas importantes incluem a clonagem molecular do gene codificador da proteína precursora do amiloide (*APP*) em 1987 (KANG et al. 1987), a detecção da mutação no gene *APP*

na DA familiar (DAF) em 1991 por GOATE et al., a identificação da apolipoproteína E4 como um fator de risco significativo em 1993 por CORDER et al. e, finalmente, a descoberta do gene da presenilina 1 (SHERRINGTON et al. 1995) e presenilina 2 por LEVY-LAHAD et al. em 1995.

1.1.1 Placas Senis

As placas senis consistem de um depósito extracelular de substância amiloide. Podem ser classificadas em placas difusas (PD) que não contêm neuritos distróficos, ou placas neuríticas (PN) que são circundadas por neuritos distróficos, microglia e astrócitos reativos. O principal componente do “núcleo” amiloide é o peptídeo amiloide- β ($A\beta$) composto por um resíduo de 40-42 aminoácidos (GLENNER e WONG 1984), embora outras proteínas estão, também, associadas com as PNs (ATWOOD et al. 2002). $A\beta$ é um fragmento proteolítico derivado de uma proteína transmembrana, conhecida como proteína precursora do amiloide (APP), pela ação de um complexo de secretases. A primeira clivagem de APP é mediada pela α - ou β -secretase. Esta última, também conhecida como BACE (VASSAR et al. 1999), gera um fragmento C-terminal conhecido como C99. O grande fragmento extracelular gerado por esta clivagem é o sAPP- β . Já a clivagem da APP pela α -secretase gera o fragmento extracelular sAPP- α e o fragmento intracelular associado à membrana C83 (BUXBAUM et al. 1998). Os fragmentos C-terminais resultantes da ação de α - ou β -secretase são subsequentemente clivados pelo complexo proteico γ -secretase (DRIES e YU 2008). A clivagem de C83 (produto da α -secretase) gera o domínio intracelular da APP (AICD, do inglês, APP-intracellular domain) e libera o peptídeo N-terminal de 3 kDa (p3) no espaço extracelular; já a

clivagem de C99 (produto da β -secretase) gera o AICD e o peptídeo $A\beta$ (Figura 1). A clivagem de APP pela α -secretase evita a formação de $A\beta$. Para que haja a produção de $A\beta$, APP tem que ser clivada pela β -secretase (LI et al. 2004).

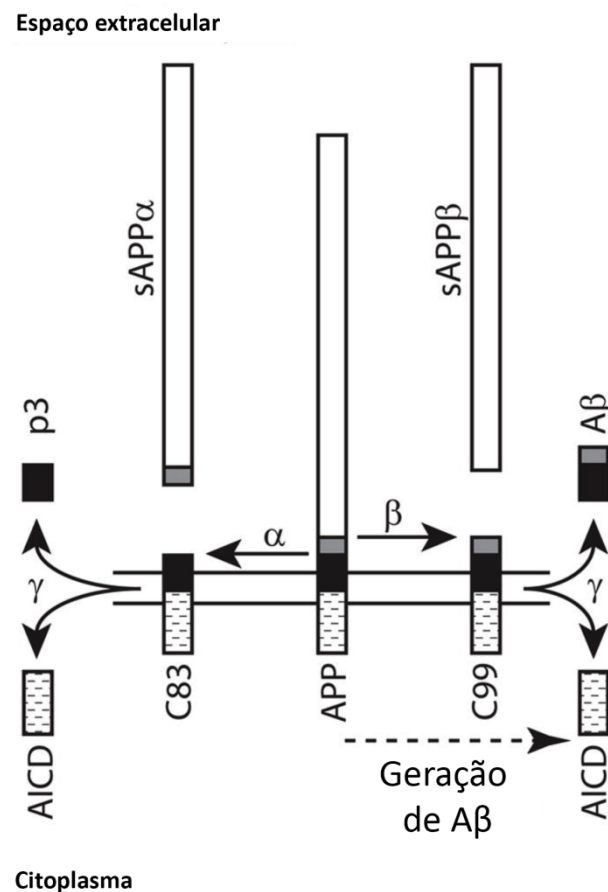


Figura 1 - Esquema do processamento de APP. O processamento de APP envolve a clivagem proteolítica por algumas secretases. A via não amiloidogênica é iniciada com a clivagem pela α -secretase e resulta na liberação de vários fragmentos solúveis. A via amiloidogênica libera $A\beta$ através das clivagens pela β - e γ -secretases.

A clivagem de APP pela γ -secretase ocorre em sítios diversos, gerando peptídeos de 37 a 49 resíduos de aminoácidos; estes peptídeos resultantes são nomeados, então, de acordo com o sítio de clivagem (A β 37 a A β 49). Nas placas neuríticas, A β ocorre principalmente na forma fibrilar como um peptídeo de 42 resíduos (A β 42), embora possa se localizar com A β 40, que é o principal produto do processamento de APP; já A β 42, mais hidrofóbico e com maior tendência de se agregar espontaneamente em fibrilas amiloides (JARRETT et al. 1993), é a forma predominante no núcleo das PN tanto em indivíduos dementados como em indivíduos sem demência (FUKUMOTO et al. 1996).

1.1.2 Emaranhados neurofibrilares

Os emaranhados neurofibrilares, a outra lesão clássica que neuropatologicamente caracteriza a DA junto com as perdas neuronal e sináptica, consistem de feixes intracelulares de fibras anormais que ultraestruturalmente aparecem como pares de filamentos entrelaçados em hélice (PHF, do inglês, paired helical filaments). PHFs são compostos da proteína tau na sua forma hiperfosforilada (GRUNDKE-IQBAL et al. 1986b). No cérebro humano adulto, seis isoformas de tau, variando de 352 a 441 aminoácidos, são produzidas por um único gene através de *splicing* alternativo (GOEDERT et al. 1989). A principal função de tau é a regulação da estabilidade dos microtúbulos, um componente estrutural do citoesqueleto neuronal que exerce papel fundamental na regulação de muitos processos celulares essenciais, como o transporte e alongamento dos axônios, assim como a geração da polaridade e forma celular (AVILA et al. 2004).

No cérebro com DA, todas as seis isoformas podem ser altamente fosforiladas. Isso diminui a afinidade de tau pelos microtúbulos, com a consequência de que as moléculas de tau passem a se ligar umas com as outras ao invés de se ligarem aos microtúbulos, desestabilizando o citoesqueleto neuronal (STOOTHOFF e JOHNSON 2005). Na DA, tau torna-se hiperfosforilada em resposta ao desbalanço das atividades fisiológicas de quinases e fosfatases (IQBAL e GRUNDKE-IQBAL 2008).

1.1.3 Fatores genéticos associados à doença de Alzheimer

A DA é geralmente classificada de acordo com sua idade de início. A maioria (>95%) dos pacientes que desenvolvem esta doença tem mais de 65 anos, sendo, então, denominada de DA de começo tardio. Já 1% – 5% dos casos de DA exibem um começo mais precoce, tipicamente antes dos 60 anos, chamada de DA de começo precoce. Tanto a de início tardio como a de início precoce são clinicamente indistinguíveis. Entretanto, esta última é geralmente mais severa e está associada a uma progressão mais rápida. Além disso, as duas formas estão associadas a diferentes padrões genéticos.

- **Doença de Alzheimer de início precoce (DAIP)**

Três genes são implicados com a fisiopatologia da DAIP, o gene *APP* e os genes das presenilinas 1 e 2 (*PSEN1* e *PSEN2*), que codificam proteínas envolvidas no processamento da APP e na geração de A β . Algumas mutações nesses três genes podem ser consideradas ‘biomarcadores diagnósticos’ desta doença: essas mutações

exibem alta penetrância (> 85%), a maior parte mostra um padrão de herança autossômica dominante, e levam à agregação de A β e ao aparecimento precoce da doença.

Mutações em *APP* são responsáveis por menos de 0,1% dos casos de DA e afetam o processamento da proteína codificada, já que estão posicionadas dentro ou próximas aos éxons codificadores de A β (exons 16 e 17) (Alzheimer Disease Mutation Database 2012).

Até o momento, 185 mutações relacionadas à DA foram identificadas em *PSENI*, enquanto somente 13 mutações foram detectadas em *PSEN2* (Alzheimer Disease Mutation Database 2012). Mutações em *PSENI* e *PSEN2* comprometem a clivagem de APP e causa um aumento na relação A β 42: A β 40, ou pelo aumento dos níveis de A β 42 ou pela diminuição de A β 40 (SCHEUNER et al. 1996).

Para resumir, os três genes causais da DAIP dão suporte a uma via patogênica comum, com um papel fundamental para A β . De acordo com esta hipótese amiloide, os processos neurodegenerativos na DA são a consequência de um desequilíbrio entre a produção e a remoção (*clearance*) de A β , sugerindo que outros genes envolvidos nessas vias podem também ser fatores de risco para esta doença.

- **Doença de Alzheimer de início tardio (DAIT)**

Os genes envolvidos na DAIT aumentam o risco para a doença. Parentes de primeiro grau de pacientes com DAIT têm o risco aumentado em duas vezes de desenvolver a doença quando comparados às pessoas que não tem parentes de

primeiro grau afetados com DA (GREEN et al. 2002). Ademais, a DA ocorre mais frequentemente em gêmeos monozigóticos que em dizigóticos (GATZ et al. 2006).

- **Apolipoproteína E**

APOE é o único gene de susceptibilidade estabelecido para a DAIT. ApoE é uma proteína ligante a lipídeos que é expressa em humanos como uma das três isoformas, que são codificadas por três diferentes alelos, denominados *APOE* $\epsilon 2$, *APOE* $\epsilon 3$, e *APOE* $\epsilon 4$. A presença de um único alelo está associada com um aumento de 2 a 3 vezes no risco de DA, enquanto que a presença de duas cópias deste alelo está associada com um aumento de 5 vezes no risco desta doença. Cada alelo de *APOE* $\epsilon 4$ herdado diminui a idade de início da DA em 6 a 7 anos (CORDER et al. 1993; POIRIER et al. 1993; KURZ et al. 1996).

- **Outras variantes de risco genético replicadas**

Depois de *APOE*, o gene associado ao risco da DAIT melhor validado é o gene do receptor 1 relacionado à sortilina (*SORL1*). A partir de estudos populacionais e de família que, juntos, incluem mais de 6.000 indivíduos de quatro grupos étnicos, Rogaeva et al. identificaram dois haplótipos nas regiões 3' e 5' de *SORL1* que estão associados com o risco da DAIT (ROGAEVA et al. 2007). Nesse estudo, os pesquisadores demonstraram que SorL1 promove a translocação e a retenção de APP em compartimentos subcelulares que exibem baixa atividade secretase, reduzindo, assim, o processamento proteolítico tanto de produtos amiloidogênicos quanto de não amiloidogênicos (ROGAEVA et al. 2007). Como consequência, a baixa expressão de *SORL1* leva a um aumento de expressão de A β e ao risco aumentado de DA.

1.2 CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS

Como já apresentado acima, após o primeiro relato da DA por Alois Alzheimer, durante as várias décadas seguintes, as atenções se voltaram para os novos achados neuropatológicos, emaranhados e placas, identificados em cérebros portadores de demência. O esforço científico, então, se concentrou no desenvolvimento de critérios, tanto clínicos como patológicos, para diferenciar o envelhecimento cerebral normal da DA.

Do ponto de vista do diagnóstico clínico, a principal classificação atualmente aceita para o diagnóstico da DA é baseada nos critérios clínicos do National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA), os quais foram estabelecidos em 1984 (MCKHANN et al. 1984). Estes critérios separam a DA de outros tipos de demência e de outras entidades associadas com declínio cognitivo, considerando padrões clínicos e neuropatológicos para diagnosticar o paciente em um dos três níveis a seguir: DA definida, provável ou possível. Os critérios originais do NINCDS-ADRDA foram revisados, em 1994, pela American Psychiatric Association (APA) através da publicação do Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV). Os critérios do NINCDS-ADRDA e DSM estão novamente sob revisão.

A primeira iniciativa de estabelecer um critério neuropatológico para a DA foi de KHACHATURIAN (1985) e baseava-se na quantificação cortical de PS. Em 1986, iniciou-se um estudo longitudinal multicêntrico com o objetivo de padronizar instrumentos para avaliar pacientes clinicamente com DA, resultando na publicação

do critério desenvolvido pelo Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD) (MIRRA et al. 1991), que baseia-se na avaliação da concentração de placas neuríticas. No mesmo ano, BRAAK e BRAAK (1991) criaram um estadiamento neuropatológico da DA, baseado na distribuição dos emaranhados neurofibrilares, composto por seis estágios distintos. O critério mais recente, criado pelo National Institute of Aging e Reagan Institute (NIA-RI), em 1997 (Anonymous 1997), procurou revisar os critérios anteriores a partir da ideia de que a DA é uma entidade clínico-patológica heterogênea e várias comorbidades podem alterar a manifestação clínica da doença. Passou-se a levar em consideração a distribuição encefálica tanto de placas neuríticas, quanto dos emaranhados neurofibrilares, combinando os critérios do CERAD e a classificação de Braak e Braak.

1.2.1 Redefinindo os estágios iniciais da DA

Os critérios diagnósticos, acima mencionados, originalmente foram criados partindo do princípio de que a DA é uma entidade clínico-patológica, sendo, então, desenhados com a expectativa de que, na maioria dos casos, sujeitos que preenchessem os critérios clínicos teriam a neuropatologia da DA, refletindo a etiologia da doença, caso fossem submetidos a um exame de autópsia. Em outras palavras, quando os critérios diagnósticos foram formulados, acreditou-se que na DA sempre existiria uma íntima correspondência entre os sintomas clínicos e a neuropatologia, de tal forma que (1) a patologia da DA e os sintomas clínicos fossem sinônimos, e (2) indivíduos ou teriam completamente desenvolvido a patologia da DA, caso fossem dementados, ou eles seriam livres da patologia da DA, caso não fossem dementados. Entretanto, mesmo após a criação dos critérios de diagnóstico

atualmente utilizados, como o CERAD e NIA-RI, que tinham o propósito de determinar um limiar neuropatológico entre senescência e senilidade, indivíduos livres de demência que apresentavam lesões cerebrais avançadas e preenchiam os critérios neuropatológicos propostos para a DA começaram a ser identificados. Estes indivíduos foram então denominados de portadores de um estágio pré-clínico da DA. A validade do conceito de DA pré-clínica é sustentada por estudos clínico-patológicos que relatam a presença de lesões características da DA em indivíduos cognitivamente normais (HULETTE et al. 1998; DAVIS et al. 1999; PRICE e MORRIS 1999; SCHMITT et al. 2000; MITCHELL et al. 2002; KNOPMAN et al. 2003) e por estudos clínicos longitudinais de alterações leves de memória seguidas por um declínio acelerado (JACOBS et al. 1995; ELIAS et al. 2000; SMALL et al. 2000; GODBOLT et al. 2005). Entretanto, um impasse no conceito da DA pré-clínica é que essa definição pressupõe que se estes indivíduos tivessem sobrevivido tempo suficiente, teriam desenvolvido os sintomas clínicos da DA. Apesar disso, não se pode excluir a possibilidade de que alguns indivíduos possam tolerar lesões neuropatológicas substanciais, mas não desenvolverem demência, sendo, portanto, pacientes assintomáticos. Recentemente, grupos especialistas em DA lançaram um novo guia para o diagnóstico da doença (JACK et al. 2011), denominando estes indivíduos de pré-sintomáticos (SPERLING et al. 2011). Na verdade, o que importa não é a denominação dada a esses indivíduos, mas sim o fato de que eles apresentam as mesmas lesões cerebrais de idosos com demência, na mesma faixa de idade, e são cognitivamente normais. Dessa forma, esses indivíduos “pré-sintomáticos” ou “assintomáticos” são um alvo de extrema importância para o estudo de mecanismos compensatórios cerebrais e cognitivos, e também para o diagnóstico precoce.

A capacidade de pacientes com DA “assintomática” lidar melhor com danos cerebrais tem sido, recentemente, explicada pela hipótese da reserva cognitiva (STERN 2006). A ideia de reserva contra danos cerebrais origina-se de observações de que não parece existir uma relação direta entre o grau de patologia ou dano cerebral e a manifestação clínica desse dano. Por exemplo, KATZMAN et al. (1989) descreveu 10 casos de idosas cognitivamente normais que apresentaram, na autópsia, patologia avançada da DA em seus cérebros. Eles especularam que estas mulheres não manifestavam características clínicas da DA porque seus cérebros eram maiores do que a média, conferindo a elas uma “reserva cerebral”.

Reserva cerebral segundo KATZMAN (1993) é um exemplo do que poderia ser chamado de modelo passivo de reserva, onde a reserva deriva, por exemplo, do tamanho cerebral ou da quantidade de neurônios. Os modelos são passivos porque a reserva é definida em termos da quantidade de dano cerebral que pode ser sustentada antes de se alcançar um limiar para a manifestação clínica. O modelo de limiar (KNOPMAN et al. 2003), gira em torno da construção da “capacidade de reserva cerebral” (CRC). Embora, a CRC seja uma construção hipotética, exemplos concretos podem incluir tamanho cerebral ou contagem sináptica. O modelo reconhece que existem diferenças individuais na CRC e também pressupõe que há um limiar crítico da CRC. Uma vez que a CRC seja depletada e passado este limiar, déficits clínicos ou funcionais específicos emergem. Em contrapartida, o modelo de reserva cognitiva (RC) sugere que o cérebro tenta, ativamente, lidar com o dano cerebral por usar mecanismos de processamento cognitivos preexistentes ou por recrutar mecanismos compensatórios (STERN 2002). Indivíduos com mais RC teriam um êxito maior em lidar com a mesma quantidade de dano cerebral. Assim, a

mesma quantidade de dano ou patologia cerebral terá efeitos diferentes em pessoas diferentes, mesmo se a CRC (por exemplo, tamanho cerebral) é mantida constante. O conceito de RC fornece uma explicação do por que estudos têm demonstrado que altos níveis de inteligência e de educação são bons indicadores de que indivíduos possam suportar maior dano cerebral antes de demonstrar déficit funcional (BENNETT et al. 2005; ROE et al. 2007). Ao invés de colocar, grosseiramente, o cérebro destes indivíduos como anatomicamente diferentes daqueles com menos reserva, a hipótese da RC postula que eles processam tarefas de maneira que os permitem lidar melhor com os danos cerebrais (BUCKNER 2004).

Com o intuito de investigar os possíveis mecanismos moleculares da reserva cognitiva, nós avaliamos a expressão gênica de (1) indivíduos que preenchiam tanto os critérios clínicos, quanto patológicos da DA (DA-CP), (2) indivíduos que preenchiam somente os critérios patológicos da DA, sem sintomas clínicos de demência (DA-P) e (3) sujeitos com envelhecimento normal (N) através da técnica de *cDNA microarray*. Nossos resultados mostraram que genes envolvidos com ciclo celular e plasticidade sináptica conseguem distinguir/classificar indivíduos com DA sintomática (DA-CP) e indivíduos com DA assintomática (DA-P) (SILVA et al. 2012). Como DA-CP e DA-P possuem os mesmos níveis de lesões neuropatológicas, mas diferem na manifestação clínica da doença, tais processos biológicos podem representar um mecanismo de proteção (reserva cognitiva) para esses indivíduos assintomáticos, ajudando a mantê-los cognitivamente normais.

1.3 CICLO CELULAR NA DA

1.3.1 Regulação do ciclo celular

O ciclo celular, ou ciclo de divisão celular, em eucariotos caracteriza-se por uma série de eventos que levam ao crescimento celular, duplicação do DNA, segregação cromossômica e a criação de duas células filhas a partir de uma célula progenitora. Esse processo consiste de quatro fases distintas: G1, S, G2 e M (Figura 2). Células quiescentes permanecem em G0 e são induzidas a reentrar no ciclo celular por estímulos mitogênicos (ASSOIAN e SCHWARTZ 2001; HO e DOWDY 2002). A fase G1 é o período de crescimento e preparação para divisão. G1 é seguida pela fase S, na qual uma maquinaria de síntese de DNA replica o material genético e o número cromossômico é duplicado. A célula, então, prepara-se para a divisão em um período conhecido como fase G2. Finalmente, durante a fase M (mitose), os cromossomos se condensam e movem-se para polos opostos das células, o citoplasma é dividido e duas células filhas são criadas. Todo esse processo biológico é orquestrado pela expressão e ativação de proteínas do ciclo celular, incluindo ciclinas, quinases dependentes de ciclina (CDKs) e inibidores de CDKs (CKIs), que formam uma rede complexa e altamente integrada (KOHN 1999). A função essencial da maquinaria do ciclo celular é a ativação e inativação periódica e ordenada de CDKs (HAN et al. 2005).

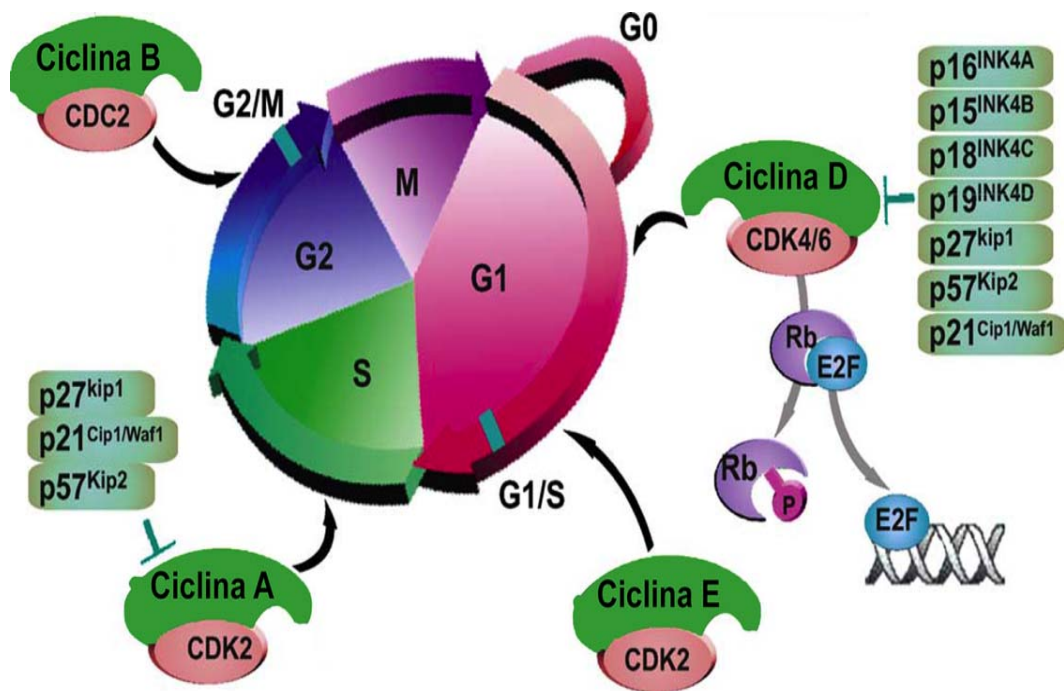


Figura 2 - Progressão do ciclo celular. O ciclo celular passa pelas fases G0, G1, S, G2 e M para completar a divisão celular. A progressão é regulada pela expressão e ativação de ciclinas, CDKs e CKIs. A ciclina D interage com CDK4/6 para formar o complexo CDK4/6-ciclina D que prepara a célula para entrar na fase G1. Este complexo fosforila Rb e libera E2F para ativar transcrição do DNA, o que garantirá a produção das proteínas do ciclo celular necessários para a continuação do ciclo. Para a passagem de G1 para a fase S e início da duplicação do DNA, CDK2 forma um complexo com ciclina E. Durante a fase S, o complexo CDK2-ciclina E é desfeito e CDK2 se associa com ciclina A para garantir a duplicação do material genético. Na fase G2, CDC2 (CDK1) forma um complexo com ciclina B, avançando, assim, para a fase de mitose. A progressão do ciclo celular pode ser interrompida por inibidores de CDKs (CKIs), como p27, p21, p16, entre outros.

A progressão de G1 é controlada pela ciclina D, que ativa Cdk4 e Cdk6, e pelas atividades de ciclina E-Cdk2 e ciclina A-Cdk2, que regulam a entrada e progressão da fase S. Ciclina D interage com Cdk4 para formar o complexo cataliticamente ativo Cdk4-ciclina D, que fosforila Rb para liberar o complexo Rb-E2F e permitir a atividade transcricional de E2F. A fosforilação de Rb define a passagem de um ‘ponto de restrição’ crítico a partir do qual a célula é irrevogavelmente comprometida a entrar na fase S, independentemente da presença ou ausência de estímulo extracelular (TANNOCH et al. 2000). Entrando na fase S, o complexo Cdk2-ciclina E precisa ser silenciado para evitar a reduplicação do DNA (MALUMBRES e BARBACID 2005). Uma vez que Cdk2 não esteja associada com ciclina E, ela interage com ciclina A recém-sintetizada. O complexo Cdk2-ciclina A fosforila proteínas requeridas para a realização e saída da fase S. Durante G2, a ciclina A é degradada, enquanto que ciclina B é sintetizada. Como consequência, Cdk1 associa-se com ciclina B, que é essencial para desencadear a mitose (LI et al. 1997). Posteriormente, a perda progressiva da atividade de Cdk1-ciclina B é essencial para que ocorra a divisão celular (PINES 2006). Nessa rede, moléculas de ativação e inibição interagem, formando alças de retroalimentação positiva e negativa que controlam a dinâmica do ciclo celular.

Ademais, a progressão do ciclo celular pode ser bloqueada por inibidores de CDKs (Figura 2). Estes inibidores compõem duas famílias, Cip/Kip e INK4. A família Cip/Kip, que inclui p21^{Cip1/Waf1}, p27^{kip1} e p57^{kip2}, interage com uma gama de complexos Cdk-ciclina; enquanto que a família INK4, incluindo p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p18^{INK4C} e p19^{INK4D}, especificamente inibe Cdk4 e Cdk6 (BESSION et al. 2008). As

proteínas INK4 agem impedindo a interação da ciclina D com as Cdks 4 e 6. Já as proteínas Cip/Kip agem sobre Cdk-ciclina formando um complexo ternário.

1.3.2 Ciclo celular em neurônios

O desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) começa a partir de uma camada microscópica de algumas centenas de células ectodérmicas (a placa neural), mas, rapidamente, desenvolve-se em uma estrutura macroscópica com bilhões de neurônios. Esta enorme expansão no número de células depende de um padrão bem regulado de divisão celular para que haja o desenvolvimento apropriado do cérebro.

Duas regiões são bastante importantes durante o desenvolvimento neural, a zona ventricular e a zona subventricular. A zona ventricular (ZV) parece ser altamente estratificada (pseudoestratificada): a mitose e a citocinese (processo que divide, fisicamente, o núcleo e o citoplasma de uma célula na fase M em duas células filhas) ocorrem na superfície ventricular, enquanto que outras fases do ciclo celular, incluindo a síntese de DNA, ocorrem a alguma distância do ventrículo (HERRUP e YANG 2007) (Figura 3). Uma zona germinativa secundária, a zona subventricular (ZSV), desenvolve-se mais tarde, um pouco além da zona ventricular. Ambas são regiões nas quais os neurônios sofrem sua divisão celular final (ou aniversário neuronal) – momento em que um neurônio sai da mitose e diferencia-se em vez de re-entrar em um novo ciclo celular. Além disso, cada região gera neurônios bem como células da glia, embora existam diferenças moleculares e citológicas entre as duas regiões (NOCTOR et al. 2004; BONNERT et al. 2006). Até o fim do período de desenvolvimento, a ZV é depletada de células mitóticas, enquanto que a ZSV

persiste no lúmen dos ventrículos laterais, abrigando células-tronco que dão origem a neurônios no adulto (AIMONE et al. 2006; SOHUR et al. 2006; TAUPIN 2006).

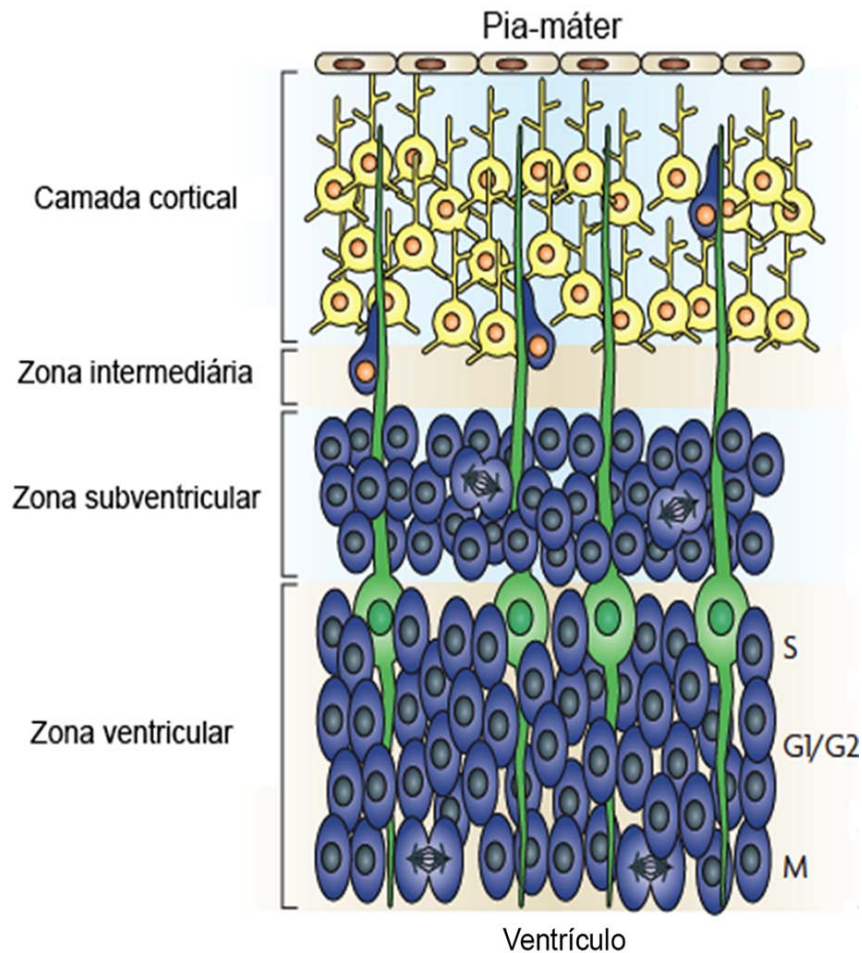


Figura 3 - Córtex cerebral em desenvolvimento. Representação gráfica de um corte transversal da parede do tubo neural. As zonas morfológicas são descritas na esquerda da figura. Células neuroepiteliais em divisão estão mostradas em azul, células da glia em verde e neurônios corticais maduros (ou em maturação) em amarelo. A estratificação proposta nas fases do ciclo celular (G1, S, G2, M) na zona ventricular (ZV) está indicada. A zona subventricular (ZSV) possui atividade mitótica, mas não possui a estratificação da ZV. O córtex maduro é gerado por ondas sucessivas de células imigrantes da ZV resultando em um padrão de estratificação ‘de dentro pra fora’, onde os neurônios primeiramente gerados residem em camadas mais profundas, enquanto os neurônios gerados mais tardiamente residem em camadas mais superficiais.

O mecanismo que leva ao fim do período de divisão celular neuronal na ZV ou na ZSV é incerto, e cada neurônio apresenta um ‘aniversário’. Esta divisão celular final não só sinaliza o começo da maturação, mas também marca o ponto no qual a célula nervosa deve colocar em prática os mecanismos que irão assegurar uma parada mitótica permanente. Assim, proteínas do ciclo celular, como Cdks e ciclinas, não mais exercerão um papel significativo em neurônios diferenciados (pós-mitóticos), havendo uma redução considerável de suas atividades no SNC (NGUYEN et al. 2002). Além disso, outro importante mecanismo no controle do ciclo celular em neurônios maduros são as CKIs, que bloqueiam a atividade dos complexos CDKs-ciclinas (PAVLETICH 1999). Embora a expressão de Cdks seja reduzida em células neuronais maduras, uma Cdk - Cdk5 - começa a ser expressa conforme o neurônio se diferencia (TSAI et al. 1993). Durante o desenvolvimento, Cdk5 exerce papel crucial no crescimento de neuritos, migração de axônios e corticogênese. Em neurônios maduros, Cdk5 participa de múltiplos processos, incluindo funções motoras, plasticidade e neurotransmissão (NGUYEN et al. 2002). Apesar de, classicamente, não ser relacionada ao ciclo celular, Cdk5 vem sendo recentemente demonstrada como um importante supressor do ciclo celular em neurônios pós-mitóticos (LOPES e AGOSTINHO 2011; ZHANG e HERRUP 2011).

Apesar da rígida regulação do ciclo celular, este processo pode ser perturbado por alguns estímulos, como excitotoxicidade, estresse oxidativo, danos de DNA ou isquemia, forçando neurônios maduros a deixar um estado estacionário, G0, e re-entrar no ciclo celular (KATCHANOV et al. 2001; NGUYEN et al. 2003; KRUMAN et al. 2004; KUAN et al. 2004). O ciclo celular, então, progride para o ponto de checagem G1/S, onde é normalmente parado. Entretanto, ao invés de se re-

diferenciar, os neurônios avançam para a fase S e progridem para morte celular apoptótica (NAGY 2000; COPANI et al. 2001; LIU e GREENE 2001). Embora a passagem da fase G1 esteja fortemente relacionada à re-expressão de Cdks (Cdk4 e 2), uma parte muito importante na parada do ciclo celular é exercida pela proteína retinoblastoma (Rb). Estudos com o antígeno T do vírus 40 dos símios (SV40-T), que pode causar vários tipos de tumores (VILCHEZ e BUTEL 2004), mostraram que o SV40-T, quando introduzido em vários tipos celulares de mamíferos (exceto neurônios), fosforila Rb, o que permite sua liberação de E2F-1 (AHUJA et al. 2005), promovendo a transcrição de vários genes do ciclo celular e, então, as células adquirem uma alta capacidade proliferativa (SIMIN et al. 2004). Entretanto, quando inserido em neurônios diferenciados, o antígeno T leva à neurodegeneração (FEDDERSEN et al. 1992; MCLEAR et al. 2006), sendo que a fosforilação de Rb fará com que neurônios ultrapassem o ponto de checagem G1/S e a síntese de DNA ocorra (como confirmado pela incorporação de BrdU) (WEN et al. 2005; HÖGLINGER et al. 2007). Mesmo assim, estes neurônios nunca alcançam a fase M e em algum ponto entre as fases S e G2, eles degeneram (HERNÁNDEZ-ORTEGA et al. 2007).

1.3.3 Alterações do ciclo celular na DA

Nos últimos anos, a desregulação do ciclo celular na DA tem atraído muita atenção. Eventos do ciclo celular têm sido descritos em cérebros de pacientes, assim como em vários modelos animais e em cultura celular (BUSSE et al. 1998; WU et al. 2000; YANG et al. 2006; MCSHEA et al. 2007). As proteínas chaves necessárias para a progressão do ciclo celular (Cdks e ciclinas) estão aumentadas em cérebros

humanos com DA. O acúmulo de Cdk4, uma quinase importante para a fase G1 do ciclo celular, combinado com seu inibidor, p16, foram primeiramente notados por MCSHEA et al. (1997) em neurônios piramidais do hipocampo de cérebros com DA (MCSHEA et al. 1997). Este achado foi, mais tarde, confirmado por Busser e outros, que encontraram a expressão aumentada de várias proteínas relacionadas ao ciclo celular, como PCNA, ciclina B, ciclina D e Cdk4, em regiões cerebrais afetadas na DA (BUSSER et al. 1998; MALIK et al. 2008). Subsequentemente, alterações em outras proteínas do ciclo celular, como Rb, E2F, cdc2 (Cdk1), ciclina B, p27 e p27 fosforilada, foram encontradas associadas à DA (VINCENT et al. 1997; GIOVANNI et al. 1999; TSUJIOKA et al. 1999; OGAWA et al. 2003).

A re-expressão de marcadores do ciclo celular na DA indica que neurônios diferenciados reentram no ciclo celular. Porém, para uma melhor caracterização desse processo, ainda faltavam ser demonstrados duplicação do DNA e divisão celular em neurônios. YANG et al. (2001) demonstraram que alguns neurônios piramidais do hipocampo em cérebros com DA apresentam o DNA duplicado (tetraploide). Interessantemente, neurônios de controles normais também foram encontrados hiperploides (3n ou 4n), porém uma fração maior de neurônios, em amostras de cérebros humanos com DA, possui conteúdo tetraploide de DNA e expressa ciclina B, um marcador de transição das fases G2/M (MOSCH et al. 2007), sugerindo, assim, uma progressão para além da fase S. No entanto, não há evidências de que a mitose seja completada nesses neurônios, pois não se encontram eventos característicos dessa fase, como condensação cromossômica, formação de fusos mitóticos e divisão celular, indicando que o ciclo celular fica estacionado na fase G2/M (VINCENT et al. 1997). Consequentemente, ao invés de entrar na fase M,

neurônios adultos, que apresentam múltiplos marcadores de ciclo celular, entram em processo de morte celular. Muitas observações suportam a ideia de que, na DA, a re-entrada de neurônios pós-mitóticos no ciclo celular causa morte neuronal (GIOVANNI et al. 1999; CHEN et al. 2000; GIOVANNI et al. 2000; MCPHIE et al. 2003; HERRUP et al. 2004; BISWAS et al. 2005; BISWAS et al. 2007; MAJD et al. 2008).

1.4 JUSTIFICATIVA

Os estudos de ciclo celular, em sua maioria, avaliam poucos marcadores. Ademais, as alterações de expressão desses marcadores foram descritas comparando indivíduos que possuem a neuropatologia da DA e a demência clinicamente caracterizada com indivíduos normais (controles). Portanto, um estudo sistemático que consiga integrar a avaliação de marcadores de várias fases do ciclo celular, além de marcadores de morte celular, não só em indivíduos com DA e normais, mas também em indivíduos com DA pré-clínica, irá ajudar sobremaneira o melhor entendimento dos mecanismos fisiopatológicos e da manifestação clínica da doença.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar se existem diferenças na expressão de marcadores relacionados à eventos de ciclo celular e morte celular entre indivíduos com DA clínico-patológica (sintomática), DA pré-sintomática/assintomática e indivíduos normais (controles).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar a expressão proteica de marcadores do ciclo celular nas seguintes fases: G0/G1 e G1/S (Cdk5, Cdk4, ciclina D, Rb, fosfo-Rb, E2F1 e p27), G2/M (Cdk1, ciclina B) através de imuno-histoquímica.
- b) Avaliar a duplicação do material genético através da hibridização fluorescente *in situ* (FISH) - cromossomos 18, 21 e X.
- c) Avaliar morte celular através de um ensaio baseado na técnica de TUNEL (do inglês, *terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nickend labeling*).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

Este estudo foi realizado de maneira retrospectiva e transversal, cujas informações clínicas foram obtidas através de informantes e os dados anátomopatológicos foram obtidos pela captação de tecido encefálico pós-morte. Indivíduos com idade igual ou superior a 80 anos submetidos a exame necroscópico entre os anos de 2004 e 2007 foram provenientes do Banco de Encéfalos Humanos do Grupo de Estudos de Envelhecimento Cerebral da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (GRINBERG et al. 2007).

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antônio Prudente – Hospital A.C. Camargo/SP, em parecer que recebeu o número: 1232/09.

3.1.1 Critérios de Inclusão e Exclusão

A) Critérios de inclusão

- a) Indivíduos com idade superior ou igual a 80 anos na data da morte.
- b) Consentimento livre e esclarecido por escrito, aplicado pelo Projeto Envelhecimento Cerebral e aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, assinado por familiar ou responsável.

- c) Preenchimento do protocolo clínico com informações relacionadas à história pregressa, antecedentes pessoais, cognição e funcionalidade do indivíduo, obtidas de maneira completa com familiar de convívio próximo com o indivíduo estudado.

B) Critérios de exclusão

- a) Indivíduos que morreram por causas cerebrais primárias: acidente vascular encefálico de origem isquêmica ou hemorrágica, traumatismo craniano, meningite, tumores, etc.
- b) Pacientes que passaram por situações com o potencial de causar lesões cerebrais isquêmicas secundárias como, por exemplo, encefalopatia anóxica de longa duração.
- c) 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.
- d) Inexistência do cuidador primário ou familiar responsável para fornecer informações adequadas relacionadas à história pregressa, antecedentes pessoais e funcionalidade do indivíduo. Discrepâncias evidentes das informações contidas em dois instrumentos ou escalas.
- e) Pacientes com uso crônico de benzodiazepínicos (período maior do que 6 meses).

3.1.2 Avaliação Clínica

No momento da chegada dos familiares ao Serviço de Verificação de Óbitos, um informante, de convívio frequente com o falecido, ou seja, maior que uma vez por semana, foi eleito para fornecer os dados clínicos, através da aplicação de um protocolo estruturado de entrevista.

Em todos os casos, antes da aplicação da entrevista, o informante era apresentado ao estudo, estimulado a ler ou a ouvir a leitura do Termo de Consentimento Informado e quando em concordância, deveria assiná-lo.

A entrevista era então conduzida por uma equipe de gerontólogos extensamente treinada na aplicação das escalas utilizadas. Durante a entrevista, o examinador julgava se as informações fornecidas eram suficientes para classificar o indivíduo, assim como a sua confiabilidade.

Os informantes foram entrevistados em salas privativas e as informações obtidas foram mantidas em caráter sigiloso. Sempre que possível, mais de uma pessoa foi entrevistada para confirmação dos dados obtidos.

- **Avaliação cognitiva**

Foi utilizado o Escore Clínico de Demência (CDR, do inglês *Clinical Dementia Ratio*) – (BURKE et al. 1988; MORRIS 1993). Esta escala tem 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. O CDR classifica a atividade cognitiva em

cinco níveis: CDR 0 – normal; CDR 0,5 – questionável, também considerado como comprometimento cognitivo leve; CDR 1 – demência leve; CDR 2 – demência moderada; CDR 3 – demência avançada.

3.1.3 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 (do inglês, *Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease*), respectivamente.

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

O CERAD segundo MIRRA et al. (1991) utiliza a semi-quantificação de placas neuríticas (PN), onde são considerados 4 níveis: CERAD 0: ausência de placas neuríticas, CERAD A: leve (1-5 por campo 100X), CERAD B: moderada (6-15 por campo 100X), e CERAD C: frequente (>15 por campo 100X).

Para efeito de classificação das amostras, 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.

3.1.4 Classificação das amostras baseada nos parâmetros clínicos e patológicos

Através dos critérios de correlação clínicos e neuropatológicos, as amostras foram categorizadas da seguinte maneira:

- a) Doença de Alzheimer clínico-patológica (DA-CP) - 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 patológica/présintomática (DA-P) - indivíduos com DA no exame anatomopatológico (Braak = IV / V / VI e CERAD = B / C) e sem comprometimento cognitivo ($CDR = 0$).
- c) Envelhecimento Normal (N) - indivíduos sem DA no exame anatomopatológico (Braak = 0/ I / II e CERAD = 0 / A) e sem comprometimento cognitivo ($CDR = 0$).

Foram selecionados 64 sujeitos - 20 do grupo DA-CP, 13 do grupo DA-P e 31 do grupo N. A seguir, encontra-se a descrição das características de cada indivíduo selecionado (Quadro 1).

#

Quadro 1 - Características das amostras selecionadas de acordo com os critérios clínicos e neuropatológicos.

GRUPO	Idade	Gênero	CDR	Braak	CERAD
DA-CP1	87	F	3	5	B
DA-CP2	83	F	3	6	C
DA-CP3	86	M	3	6	B
DA-CP4	82	F	2	5	C
DA-CP5	81	F	2	5	B
DA-CP6	81	F	2	5	C
DA-CP7	92	M	3	6	C
DA-CP8	83	F	3	6	C
DA-CP9	90	F	3	4	B
DA-CP10	82	F	3	5	C
DA-CP11	99	F	3	5	B
DA-CP12	81	F	3	6	C
DA-CP13	94	F	3	4	B
DA-CP14	84	M	3	5	C
DA-CP15	82	F	2	5	C
DA-CP16	82	F	3	6	C
DA-CP17	81	F	3	5	C
DA-CP18	82	F	3	6	C
DA-CP19	87	F	2	6	B
DA-CP20	92	F	3	6	B
DA-P1	86	F	0	6	C
DA-P2	81	F	0	5	C
DA-P3	82	M	0	4	B
DA-P4	83	F	0	3	B
DA-P5	89	F	0	4	C
DA-P6	80	M	0	4	B
DA-P7	91	M	0	4	B
DA-P8	82	M	0	4	B
DA-P9	87	F	0	5	C
DA-P10	85	F	0	5	C
DA-P11	80	M	0	4	B
DA-P12	97	F	0	3	C
DA-P13	98	F	0	3	B
N1	90	M	0	2	0
N2	92	M	0	3	A
N3	82	F	0	2	A
N4	83	M	0	2	0
N5	80	M	0	2	0
N6	82	F	0	3	0
N7	81	F	0	3	A
N8	86	M	0	1	A
N9	80	F	0	2	0

GRUPO	Idade	Gênero	CDR	Braak	CERAD
N10	95	M	0	3	0
N11	94	F	0	2	0
N12	83	M	0	1	0
N13	83	F	0	2	0
N14	83	M	0	0	0
N15	83	F	0	2	A
N16	81	F	0	1	0
N17	93	F	0	2	0
N18	82	F	0	2	0
N19	82	M	0	2	0
N20	82	F	0	2	0
N21	82	F	0	1	0
N22	82	M	0	2	0
N23	86	F	0	2	0
N24	86	F	0	2	0
N25	89	M	0	2	0
N26	82	F	0	3	0
N27	80	M	0	3	0
N28	83	F	0	1	A
N29	89	M	0	2	0
N30	81	M	0	2	0
N31	83	M	0	1	0

* Idade: anos; Gênero: F, feminino e M, masculino; CDR: Clinical Dementia Ratio; Braak: estadiamento de Braak e Braak; CERAD: Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease.

3.2 CONSTRUÇÃO DO TISSUE MICROARRAY (TMA)

O TMA foi construído utilizando-se o dispositivo técnico chamado de *tissue microarrayer* (BeecherInstruments, Silver Springs, EUA) do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo. Áreas do córtex entorrinal, hipocampo e córtex temporal foram identificadas no bloco de parafina e puncionadas com agulha de 1mm (Figura 4). 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 cilindro foi construído

em planilha de Excel[®] (Microsoft, EUA) permitindo a localização exata de cada caso (Quadro 2). O bloco de TMA foi cortado no micrótomo rotativo na espessura de 3 μm . O *tape* foi colocado contra o bloco de TMA e cortado. O *tape* com o material foi colhido em lâminas adesivas da Instrumedics (Hackensack NJ, EUA), e com a pressão manual de um rolo, o *tape* foi fixado na lâmina. A lâmina com o *tape* sofreu a irradiação com UV por 30 min, sendo em seguida mergulhada em solução solvente e seca a temperatura ambiente. Os *tapes* foram retirados após a secagem. As lâminas sofreram banho de parafina, e posteriormente, foram armazenadas em freezer -80°C .

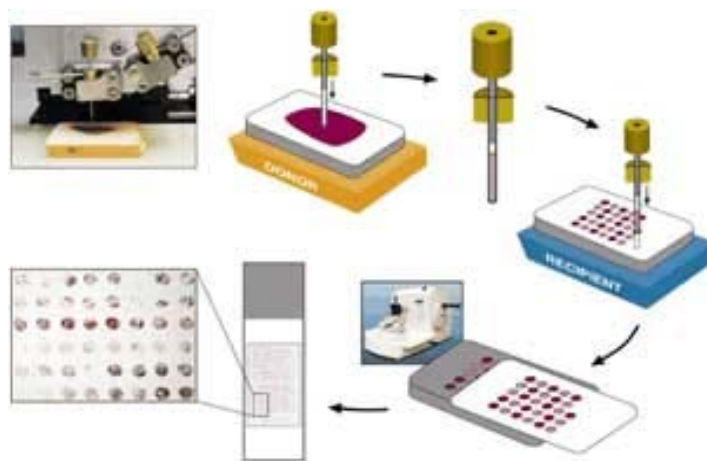


Figura 4 - Esquema mostrando a montagem do bloco de TMA e a lâmina para a análise.

Quadro 2 - Mapa da localização de cada amostra no TMA.

mm	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	mm
0	Placenta	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	05/7282 B	05/7282F 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	05/5880 B	05/5880F H	05/5880F E	07/1281 B	07/1281F H	07/1281F E	05/10921 B	05/10921F H	05/10921F E	04/9830 B	04/9830F H	04/9830F E	3
4	04/6769 B	04/6769F H	04/6769F E	04/9376 B	04/9376F H	04/9376F E	05/6377 B	05/6377F H	05/6377F E	05/7888 B	05/7888F H	05/7888F 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	05/6646 B	05/6646F H	05/6646F 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	05/6603 B	05/6603F H	05/6603F E	05/6495 B	05/6495F H	05/6495F E	07/1995 B	07/1995F H	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	2.4	3.6	4.8	6.0	7.2	8.4	9.6	10.8	12.0	13.2	14.4	15.6	16.8	18.0	mm

B, córtex temporal; E, córtex entorrinal; H, hipocampo.

Para cada indivíduo, planejou-se amostrar 3 regiões cerebrais - córtex temporal, córtex entorrinal e hipocampo. Porém, em alguns casos não foi possível obter as três regiões. Portanto, para a construção do TMA, foram utilizados 64 córtices temporais, 57 córtices entorrinais, e 62 hipocampos, totalizando 183 regiões amostradas (Figura 5).



Figura 5 - Lâmina de um corte do TMA com as amostras selecionadas.

3.3 IMUNO-HISTOQUÍMICA (IHQ)

3.3.1 Marcadores de Imuno-histoquímica

- **Ciclo celular:** Cdk1, Cdk4, Cdk5, Ciclina B1, Ciclina D1, p27^{Kip1}, Rb, fosfo-Rb e E2F1.

As reações de imuno-histoquímica foram realizadas nas lâminas de TMA, usando o sistema de visualização de polímero (Advance, DAKO®). Resumidamente,

os cortes foram desparafinizados com xilol a temperatura ambiente, sendo, posteriormente, hidratados em soluções com concentrações decrescentes de etanol (etanol 100%, 85%, e 70%, respectivamente) e lavados em água corrente e destilada. A recuperação antigênica foi feita através do calor com irradiação por panela de pressão (Eterna[®], Nigro) com a solução tampão TE (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH 9,0). O bloqueio da peroxidase endógena foi feita com solução de peróxido de hidrogênio a 3% (água oxigenada 10 vol). Para o bloqueio de proteínas inespecíficas, com finalidade de reduzir o *background*, foi utilizado o *Protein Block Serum Free* (DAKO[®]). Os tecidos foram incubados com o anticorpo primário diluído com o *Antibody Diluent with Background Reducing Component* (DAKO[®]) em título pré-estabelecido conforme a tabela abaixo (Quadro 3).

Após a incubação, as lâminas foram lavadas em tampão TBS. A seguir, foram incubadas com o anticorpos secundários *AdvancedTM HRP Link* (DAKO[®]), seguidas por lavagens com TBS, e incubação com o anticorpos polimerizados com a enzima peroxidase *AdvancedTM HRP Enzyme* (DAKO[®]). Em seguida, os cortes foram lavados com TBS, e revelados com solução de Diaminobenzidina (Liquid DAB + Substrate Chromogen System, DAKO[®]) e contra corados com hematoxilina de Harris (Merck[®]).

As reações foram acompanhadas de controle positivo, em tecido sabidamente positivo para o anticorpo testado.

Quadro 3 - Anticorpos primários utilizados nas reações de imuno-histoquímica.

Anticorpos	Clones	Diluição	Fabricantes
Cdk1	A17.1.1	1/500	Neomarkers
Cdk4	Policlonal	1/400	Vera Cruz
Cdk5	DC17 + DC34	1/200	Abcam
Ciclina B1	V152	1/300	Dako
Ciclina D1	SP4	1/25	Cell Marque
E2f1	KH95	1/200	Neomarkers
p27 ^{Kip1}	SX53G8	1/100	Dako
Rb	13A10	1/200	Novocastra
Fosfo-Rb	51B7	1/200	Abcam

3.3.2 Análise da IHQ

- **Análise semi-quantitativa**

Após a realização das reações de imuno-histoquímica, as lâminas foram digitalizadas no aparelho ScanScope XT (Aperio Technologies), e em seguida, a imagem de cada “core” (região cerebral amostrada de cada indivíduo) foi segmentada utilizando o software *SpectrumTM* (Aperio Technologies). Posteriormente, essas imagens foram utilizadas para a contagem manual (visual) dos neurônios.

A identificação dos neurônios foi baseada em parâmetros morfológicos típicos desse tipo celular. Características neuronais clássicas, como ilustrado por um neurônio motor da medula (Figura 6A), incluem corpo celular (pericário) grande, múltiplos processos citoplasmáticos e um núcleo grande com nucléolo proeminente. Em contraste a esses grandes neurônios, existem os neurônios granulares – com cerca do tamanho do nucléolo de um neurônio motor - que se caracterizam pela falta de um

citoplasma reconhecível, mas possuem um nucléolo proeminente central, o que ajuda a diferenciá-los dos astrócitos cuja morfologia assemelha-se com a dos neurônios granulares, porém difere por apresentar um nucléolo menor e mais periférico (Figura 6B). Outra característica que ajuda a diferenciar os neurônios dos demais tipos celulares do tecido nervoso é o fenômeno de satelitose perineuronal, que consiste, principalmente, de células satélites de oligodendrócitos em volta de um neurônio piramidal (Figura 6C).

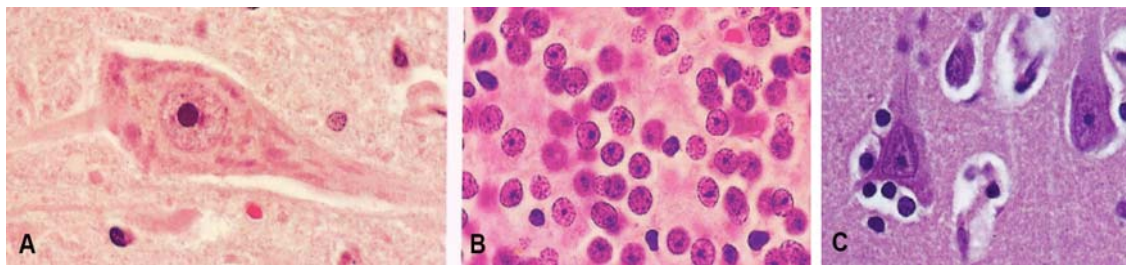


Figura 6 - Aspectos morfológicos das células neuronais. (A) Neurônio prototípico caracterizado por um grande pericário com abundante substância de Nissl (retículo endoplasmático rugoso), prolongamentos citoplasmáticos robustos, núcleo grande com nucléolo proeminente. (B) Neurônios granulares: pequenos, com citoplasma não reconhecível, apesar de possuírem um nucléolo proeminente característico. (C) Satelitose perineuronal: glia perineuronal que consiste principalmente de oligodendrócitos satélites, juntamente com astrócitos e micróglia ocasionais.

A contagem dos neurônios foi realizada com auxílio do software *ZEN lite* (ZEISS), considerando-se a marcação nuclear (Figura 7A), citoplasmática (Figura 7B) e a intensidade das respectivas marcações.

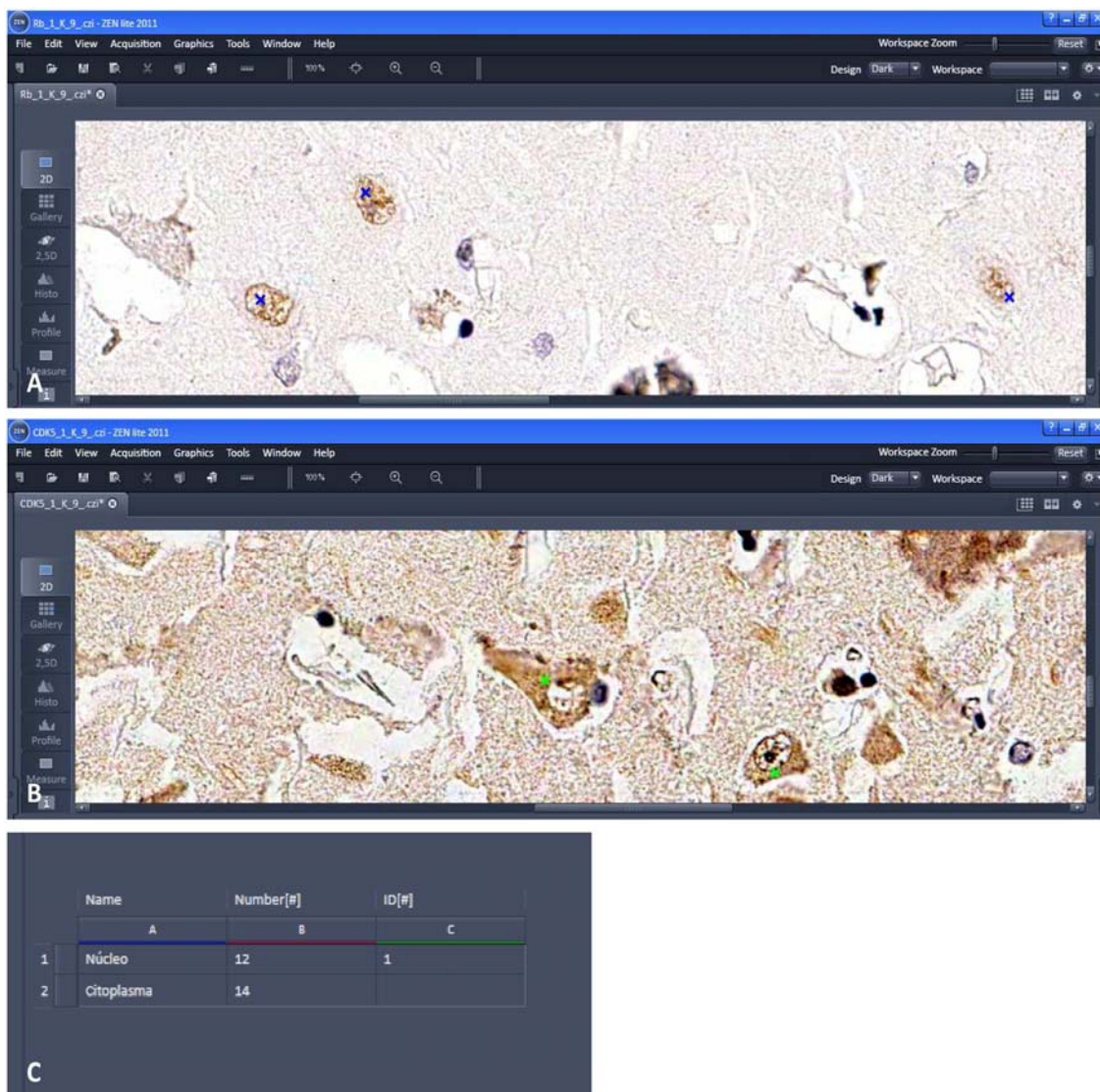


Figura 7 - Contagem de células neuronais utilizando o software ZEN lite. (A) Seleção de marcação nuclear (cruz na cor azul). (B) Seleção de marcação citoplasmática (cruz na cor verde). (C) Depois de selecionadas, as células marcadas, o número total de núcleos e citoplasmas eram discriminados.

Para efeito de análise dos dados, não foi utilizado somente o número absoluto de neurônios marcados (positivos); também foi levado em consideração o número total de neurônios nas amostras. Como era praticamente inviável contar todos os neurônios pra cada *core*, uma estimativa do número de neurônios de cada região encefálica (córtex temporal, hipocampo e córtex entorrinal) foi realizada utilizando 5

indivíduos controles (normais) em 3 níveis (cortes) diferentes, conforme ilustrado na figura abaixo (Figura 8).

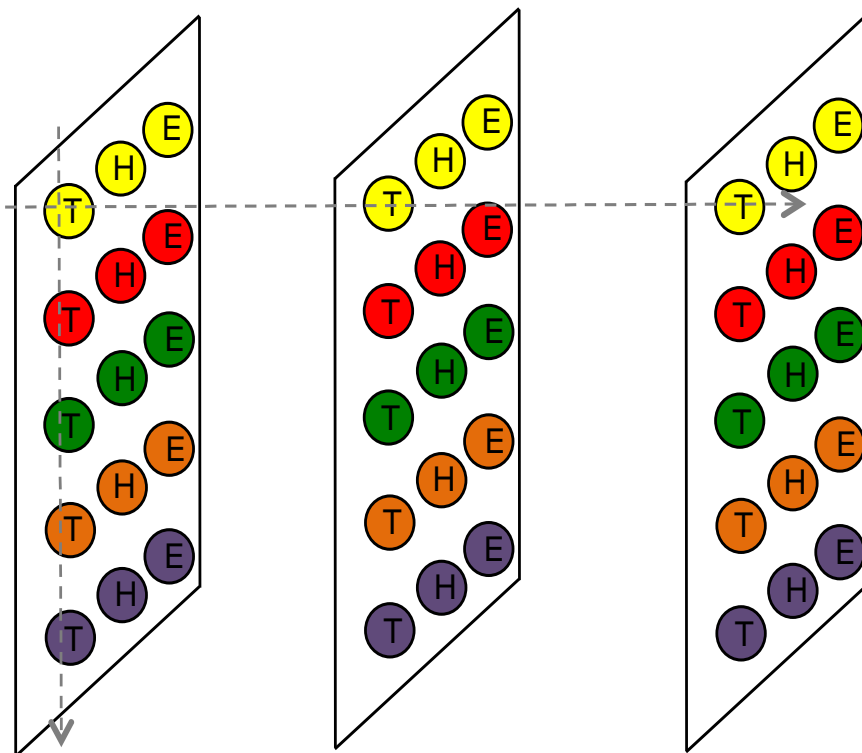


Figura 8 - Esquema ilustrativo do método utilizado para a estimativa da quantidade de neurônios no córtex temporal (T), hipocampo (H) e córtex entorrinal (E). Foram selecionadas as amostras de 5 indivíduos e feita a contagem do número total de neurônios. A estimativa foi baseada na média do número de células intra- e inter-lâminas para cada região cerebral.

A análise estatística dos dados, então, foi composta pela porcentagem de células marcadas (positividade) e a intensidade de marcação. A esses dois parâmetros de análise, foram atribuídos escores, como a seguir:

- **Positividade (p)** = número de neurônios marcados / número total de neurônios (estimado)
 - 0 – sem marcação neuronal
 - 1 - $p \leq$ Percentil 33% ($P_{0,33}$)

- 2 - $P_{0,33} < p \leq P_{0,66}$
- 3 - $p > P_{0,66}$

- **Intensidade de marcação (*I*)**
 - 0 – sem marcação
 - 1 – Fraca
 - 2 – Fraca - moderada
 - 3 – Moderada
 - 4 – Moderada – forte
 - 5 – Forte

O valor de expressão (*E*) de cada marcador foi definido conforme a seguinte equação:

$$E = p + (n_i \times I)$$

Onde:

- *p* = positividade;
- *n_i* = número de categorias da intensidade de marcação;
- *I* = intensidade de marcação.

Dessa forma, excluímos a possibilidade de atribuir o mesmo valor de expressão para amostras com baixa positividade, porém de marcação intensa; e amostras com alta positividade, de menor intensidade.

3.4 AVALIAÇÃO DE MORTE CELULAR

A detecção de morte celular foi realizada utilizando-se o TACS[®] 2 TdT-DAB *In Situ* Apoptosis Detection Kit (TREVIGEN[®]) conforme instruções do fabricante. Esta técnica, baseada em TUNEL, detecta a fragmentação do DNA que resulta da cascata de sinalização apoptótica. Esse ensaio baseia-se na presença de fragmentos de DNA que podem ser identificados pela desoxinucleotidil transferase terminal, uma enzima que catalisa a adição de dUTPs secundariamente marcados com um anticorpo conjugado à enzima peroxidase, que quando reage com DAB gera uma coloração marrom (Figura 9).

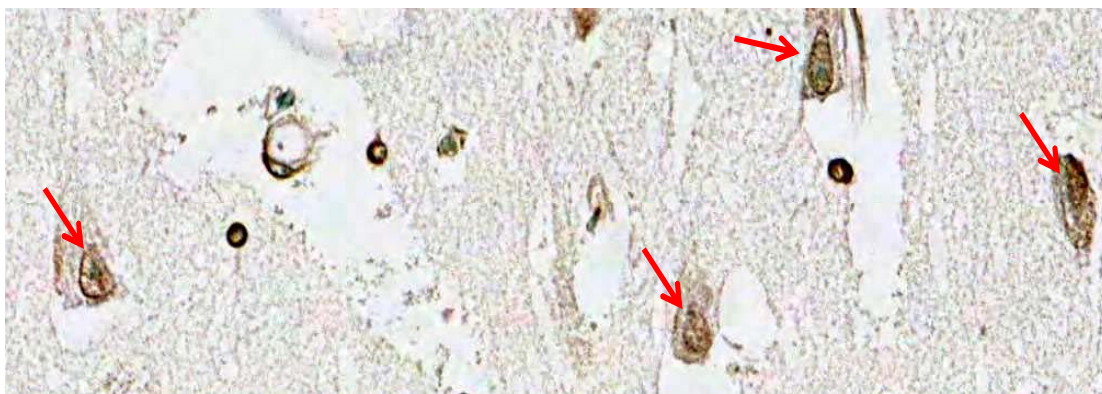


Figura 9 - Detecção de apoptose baseada na técnica de TUNEL. Setas indicam marcação positiva para morte celular.

A análise deste marcador foi realizada conforme descrito no item 3.3.2.1 (Análise semi-quantitativa) para os marcadores de ciclo celular.

3.5 IMUNOFLUORESCÊNCIA E HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE *IN SITU* (IMUNO-FISH)

Para a investigação de possíveis alterações no número cromossômico celular, a técnica de FISH foi executada com sondas centroméricas específicas para cada cromossomo de interesse, com uma adicional marcação para uma proteína de ciclo celular (ciclina B1). Foram investigados os cromossomos X (CEP X, Spectrum Green, Vysis), 18 (CEP 18, Spectrum Aqua, Vysis), e 21 (LSI 21, Spectrum Orange, Vysis), por apresentarem uma susceptibilidade maior à aneuploidia em indivíduos com DA (MIGLIORE et al. 1999; SPREMO-POTPAREVIC et al. 2004; ZIVKOVIC et al. 2006).

Os cortes de TMA foram desparafinizados com xilol a temperatura ambiente, sofrendo, posteriormente, passagens em etanol absoluto e lavados em água corrente. Os cortes foram, então, submetidos a um banho em solução de HCl 0,2N durante 20 min a temperatura ambiente, seguidos de um pré-tratamento em solução de citrato pH 6,0 a 80°C em banho-maria por 1 h. A digestão enzimática foi realizada com pepsina por 7 min, sendo que, posteriormente, as lâminas foram lavadas em solução SSC 2x por 2 min, e desidratadas em soluções com concentrações crescentes de etanol (etanol 75%, 80%, e 100%, respectivamente). As sondas foram aplicadas sobre o tecido em um volume total de 10 µl com posterior incubação no hibridizador (HybridizerStatSpin, Dako) para denaturação do DNA e hibridização da sonda. Em seguida, as lâminas foram mergulhadas em solução de UREA 1,5M/ SSC 0,1x a 45°C durante 30 min. Os cortes foram lavados em solução SSC 2x. Posteriormente, os cortes sofreram o bloqueio de proteínas inespecíficas (*Protein Block Serum Free*)

e o anticorpo primário (Ciclina B1, diluição 1:300, DAKO) foi incubado à temperatura ambiente durante 1h e a lâmina foi lavada por 3 vezes de 5 min em solução de PBS. Em sequência, o anticorpo secundário conjugado com o fluoróforo Alexa 488 (Invitrogen) foi incubado à temperatura ambiente por 1 h e a lâmina foi lavada conforme o passo anterior. Os cortes foram contracorados com meio de montagem contendo DAPI. A análise foi realizada em microscópio de fluorescência equipado com os filtros específicos para cada fluoróforo. No mínimo, 10 neurônios foram analisados em cada *core*, contando-se o número de sondas (cromossomos) nas células positivas e negativas para a ciclina B1.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis contínuas foram comparadas entre os grupos usando-se a análise de variância (ANOVA). Quando não observada distribuição normal dos dados, foi adotado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Nos casos em que foi rejeitada a hipótese de igualdade entre os grupos, estes foram comparados 2 a 2 pelo teste de Dunn. As variáveis categóricas foram analisadas através do teste chi-quadrado. $P < 0,05$ foi utilizado como critério para significância estatística. Os testes estatísticos foram executados no software GraphPad Prism (GraphPad software, Inc.). A clusterização hierárquica foi realizada com os valores de expressão dos marcadores de ciclo celular e morte celular, adotando-se a distância Euclidiana e ‘*average linkage*’ como métrica. A robustez da clusterização foi avaliada pela técnica de reamostragem *Bootstrap* com 1000 permutações no MultiExperiment Viewer (MeV – TM4 software suite).

4 RESULTADOS

Nessa tese, serão apresentados os resultados obtidos pela análise do hipocampo nos três grupos do estudo.

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Considerando os 64 indivíduos do estudo, não houve diferença estatística em relação à idade média (Tabela 1) e à distribuição de gênero (Tabela 2) entre os três grupos analisados, apesar da frequência do sexo feminino ser maior nos grupos DA-CP e DA-P.

Tabela 1 - Idade média dos indivíduos em cada grupo do estudo.

	DA-CP (n=20)	DA-P (n=13)	N (n=31)	P-valor*
Idade (média ± dp)	85,55 ± 5,24	86,23 ± 6,04	84,52 ± 4,36	0,5448

Idade, em anos, descrita como média ± desvio padrão (dp)

*ANOVA

Tabela 2 - Distribuição de gêneros entre os grupos.

	DA-CP	DA-P	N	P-valor*
Feminino	17 (85%)	8 (61,5%)	16 (51,6%)	0,0515
Masculino	3 (15%)	5 (38,5%)	15 (48,4%)	

* Teste Chi-quadrado

4.2 MARCADORES DE CICLO CELULAR

4.2.1 Cdk4

A maioria dos neurônios, exceto os da zona subventricular e alguns do hipocampo, encontra-se em um estado quiescente (fase G0), ou seja, não estão se dividindo (neurônios pós-mitóticos). As quinases dependentes de ciclina, em células que estão se dividindo, regulam a proliferação, diferenciação, senescência e apoptose. No entanto, com exceção da Cdk5, as CDKs estão silenciadas em neurônios pós-mitóticos. Na DA, têm sido reportadas alterações de proteínas que regulam o ciclo celular, incluindo as CDKs. Cdk4 é uma das principais quinases dependentes de ciclina que está envolvida no controle inicial do checkpoint G1/S, sendo muito importante, também, para a transição de G0 para G1.

Abaixo, encontram-se os resultados de expressão de Cdk4 (Tabelas 3 e 4) no núcleo (Figura 10) e citoplasma (Figura 11) do hipocampo para os três grupos do estudo.

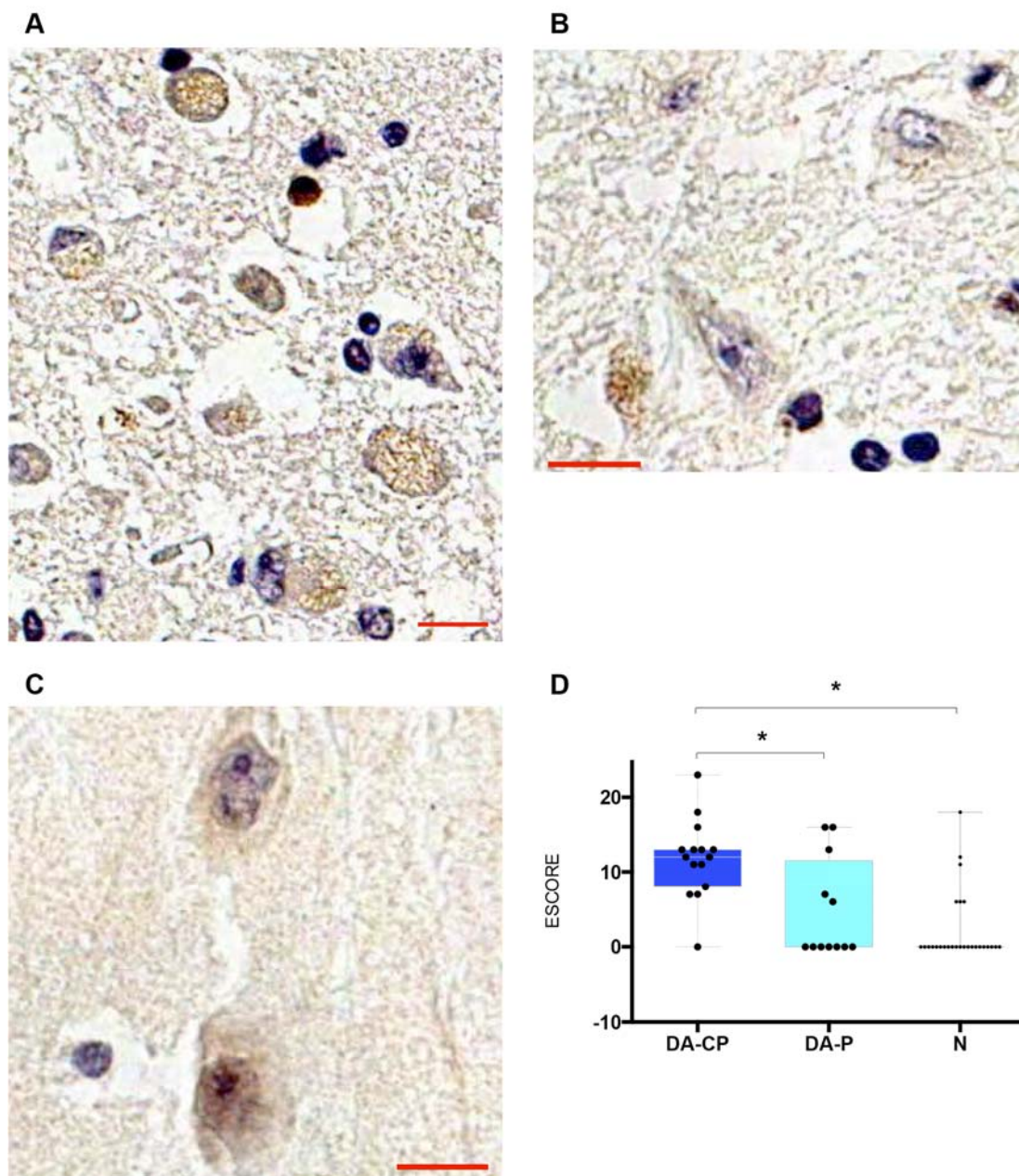


Figura 10 - Padrão de expressão nuclear do marcador Cdk4 no hipocampo de indivíduos com DA-CP (A), DA-P (B) e sujeitos normais (C) com os respectivos níveis de expressão (D). DA-CP, doença de Alzheimer clínico-patológica; DA-P, doença de Alzheimer patológica; N, envelhecimento normal. Barra de escala: 50 μ m. *, indica significância estatística ($P < 0,05$).

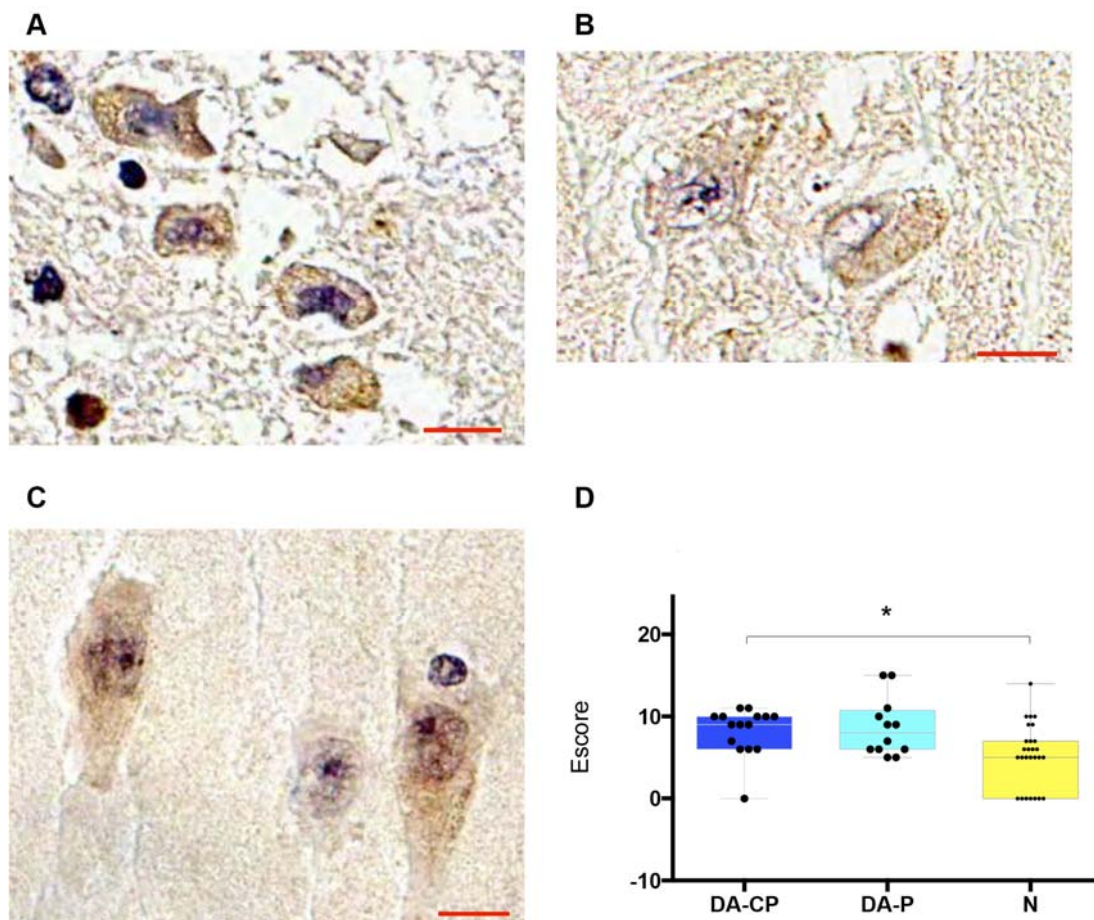


Figura 11 - Padrão de expressão citoplasmática do marcador Cdk4 no hipocampo de indivíduos com DA-CP (A), DA-P (B) e sujeitos normais (C) com os respectivos níveis de expressão (D). DA-CP, doença de Alzheimer clínico-patológica; DA-P, doença de Alzheimer patológica; N, envelhecimento normal. Barra de escala: 50 μ m. *, indica significância estatística ($P < 0,05$).

Tabela 3 - Estatística descritiva referente à expressão de Cdk4 no hipocampo.

	Núcleo			Citoplasma		
	DA-CP	DA-P	N	DA-CP	DA-P	N
Número de amostras	15	12	27	15	12	27
Mínimo	0	0	0	0	5	0
Percentil 25%	8	0	0	6	6	0
Mediana	12	0	0	9	8	5
Percentil 75%	13	11.5	0	10	10.75	7
Máximo	23	16	18	11	15	14
Média	11.8	4.833	2.185	8.267	8.667	5.259
Desvio padrão	5.267	6.645	4.674	2.89	3.551	3.809

Para verificar a significância estatística das diferenças encontradas foi realizado o teste deKruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn (Tabela 4).

Tabela 4 - Testes estatísticos para verificar significância da expressão de Cdk4 no hipocampo.

	P-valor (Núcleo)	P-valor (Citoplasma)
Kruskal-Wallis	< 0.0001*	0.0052*
Dunn		
DA-CP vs. DA-P	0.0201*	> 0.9999
DA-CP vs. N	< 0.0001*	0.0104*
DA-P vs. N	0.6165	0.0664

*, indica significância estatística ($P < 0,05$).

Portanto, em relação à análise nuclear, a maior expressão de Cdk4 observada nos indivíduos com DA-CP foi estatisticamente significativa quando comparada com a expressão nos grupos DA-P e N. Não houve diferença significativa na comparação entre DA-P e N.

Quanto à análise citoplasmática, somente houve diferença estatisticamente significativa relacionada à maior expressão de Cdk4 nos indivíduos com DA sintomática (DA-CP) quando comparados com os sujeitos com envelhecimento normal (N).

4.2.2 Ciclina D1

As ciclinas funcionam como reguladoras das CDKs. Diferentes ciclinas exibem padrões de expressão e degradação que contribuem para a coordenação temporal do ciclo celular. A ciclina D1 forma um complexo com Cdk4 e funciona como uma subunidade reguladora dessa CDK, cuja atividade é requerida para a transição G1/S do ciclo celular.

Os resultados da expressão de ciclina D no hipocampo encontram-se nas figuras e tabelas abaixo (Figuras 12 e 13, Tabelas 5 e 6).

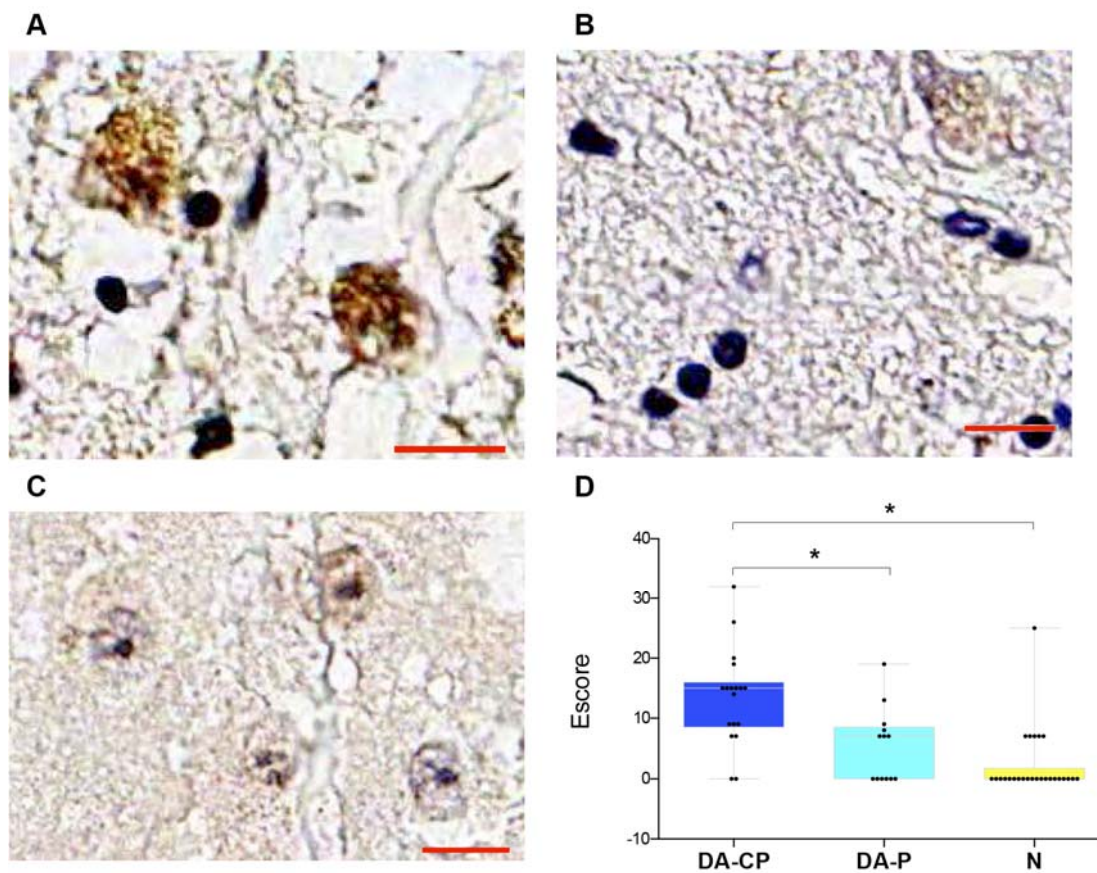


Figura 12 - Padrão de expressão nuclear do marcador ciclina D no hipocampo de indivíduos com DA-CP (A), DA-P (B) e sujeitos normais (C) com os respectivos níveis de expressão (D). DA-CP, doença de Alzheimer clínico-patológica; DA-P, doença de Alzheimer patológica; N, envelhecimento normal. Barra de escala: 50 μ m. *, indica significância estatística ($P < 0,05$).

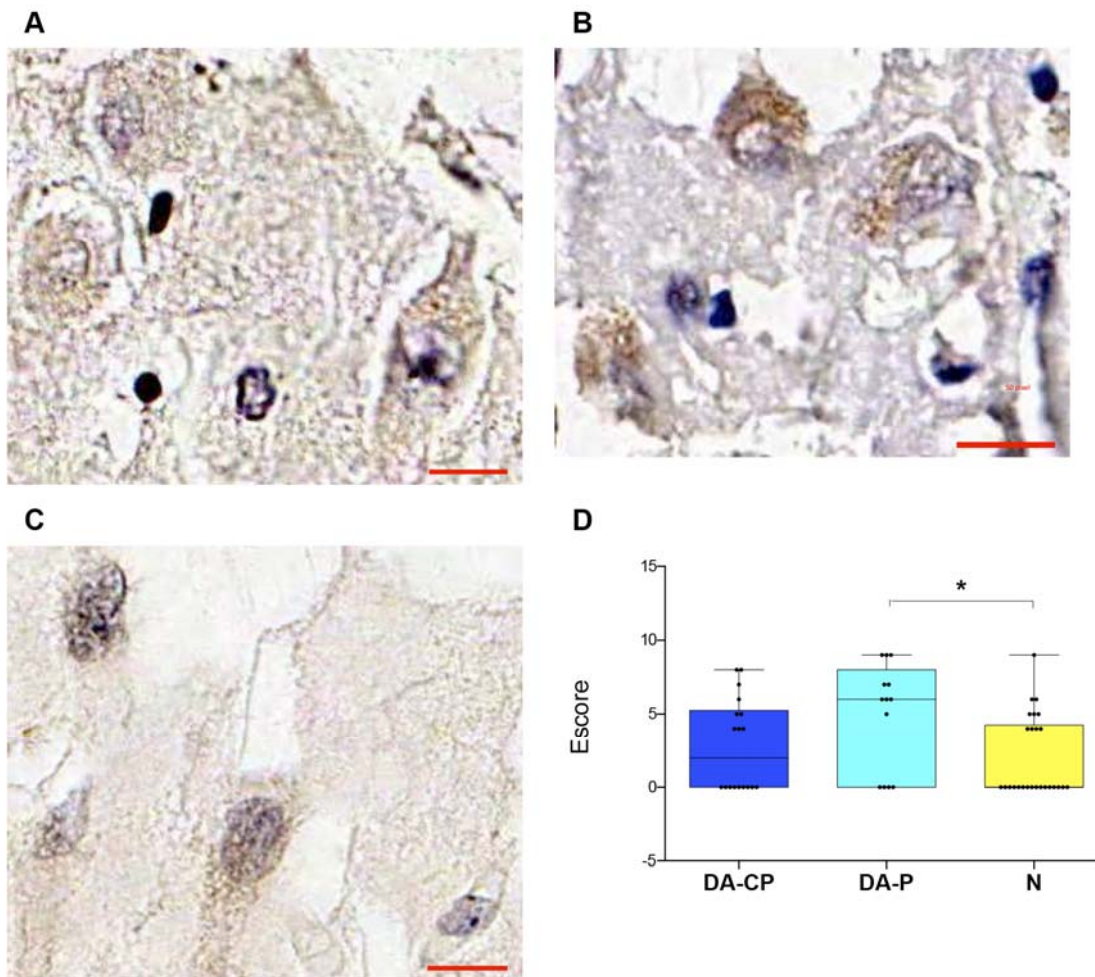


Figura 13 - Padrão de expressão citoplasmática do marcador ciclina D no hipocampo de indivíduos com DA-CP (A), DA-P (B) e sujeitos normais (C) com os respectivos níveis de expressão (D). DA-CP, doença de Alzheimer clínico-patológica; DA-P, doença de Alzheimer patológica; N, envelhecimento normal. Barra de escala: 50 μm . *, indica significância estatística ($P < 0,05$).

Tabela 5 - Estatística descritiva referente à expressão de ciclina D1 no hipocampo.

	Núcleo			Citoplasma		
	DA-CP	DA-P	N	DA-CP	DA-P	N
Número de amostras	18	13	26	18	13	26
Mínimo	0	0	0	0	0	0
Percentil 25%	8.5	0	0	0	0	0
Mediana	15	7	0	2	6	0
Percentil 75%	16	8.5	1.75	5.25	8	4.25
Máximo	32	19	25	8	9	9
Média	13.44	5.385	2.308	2.833	4.923	2
Desvio padrão	8.024	6.09	5.409	3.13	3.639	2.742

Para verificar a significância estatística das diferenças encontradas foi realizado o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn (Tabela 6).

Tabela 6 - Testes estatísticos para verificar significância da expressão de ciclina D1 no hipocampo.

	P-valor (Núcleo)	P-valor (Citoplasma)
Kruskal-Wallis	< 0.0001*	0.0257*
Dunn		
DA-CP vs. DA-P	0.023*	0.2142
DA-CP vs. N	< 0.0001*	> 0.9999
DA-P vs. N	0.3431	0.0208*

*, indica significância estatística ($P < 0,05$).

Portanto, em relação à análise nuclear, a maior expressão de ciclina D observada nos indivíduos com DA-CP foi estatisticamente significativa quando comparada com a expressão nos grupos DA-P e N. Não houve diferença significativa na comparação entre DA-P e N.

Quanto à análise citoplasmática, somente houve diferença estatisticamente significativa relacionada a maior expressão de ciclina D nos indivíduos com DA assintomática (DA-P) quando comparados com os sujeitos com envelhecimento normal (N).

4.2.3 Rb

A proteína retinoblastoma (Rb) exerce um efeito inibitório na progressão do ciclo celular pela capacidade de se ligar e inibir a atividade do fator de transcrição E2f, impedindo, assim, a transcrição de proteínas do ciclo celular no núcleo das células (LUNDBERG e WEINBERG 1998). Rb é uma fosfoproteína cuja capacidade de ligação e interação com E2f é governada por seu estado de fosforilação, que flutua conforme a célula passa pelas diferentes fases do ciclo celular: Rb é encontrada em um estado hipofosforilado em G0 e em grande parte de G1; em seguida, é convertida para um estado hiperfosforilado conforme a células se aproximam do final da fase G1, persistindo nesse estado durante todo o ciclo celular, quando, finalmente, é convertida para o estado hipofosforilado no final da fase M (MITTNACHT 1998). Portanto, Rb hipofosforilada é a forma que se liga a E2f e inibe a progressão do ciclo celular (EZHEVSKY et al. 2001).

Em seguida, encontram-se os resultados de expressão da Rb (hipofosforilada) no hipocampo (Figuras 14 e 15, Tabelas 7 e 8).

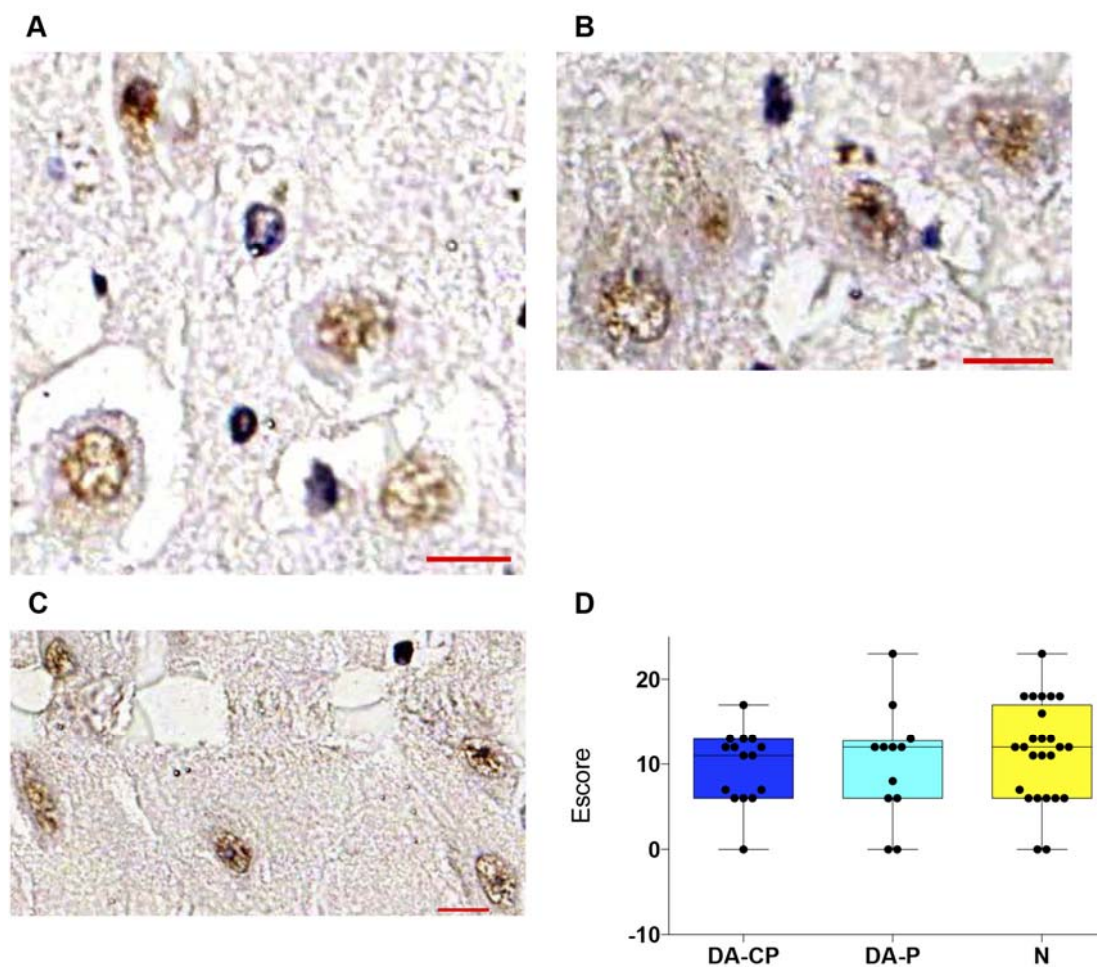


Figura 14 - Padrão de expressão nuclear do marcador Rb no hipocampo de indivíduos com DA-CP (A), DA-P (B) e sujeitos normais (C) com os respectivos níveis de expressão (D). DA-CP, doença de Alzheimer clínico-patológica; DA-P, doença de Alzheimer patológica; N, envelhecimento normal. Barra de escala: 50 μ m.

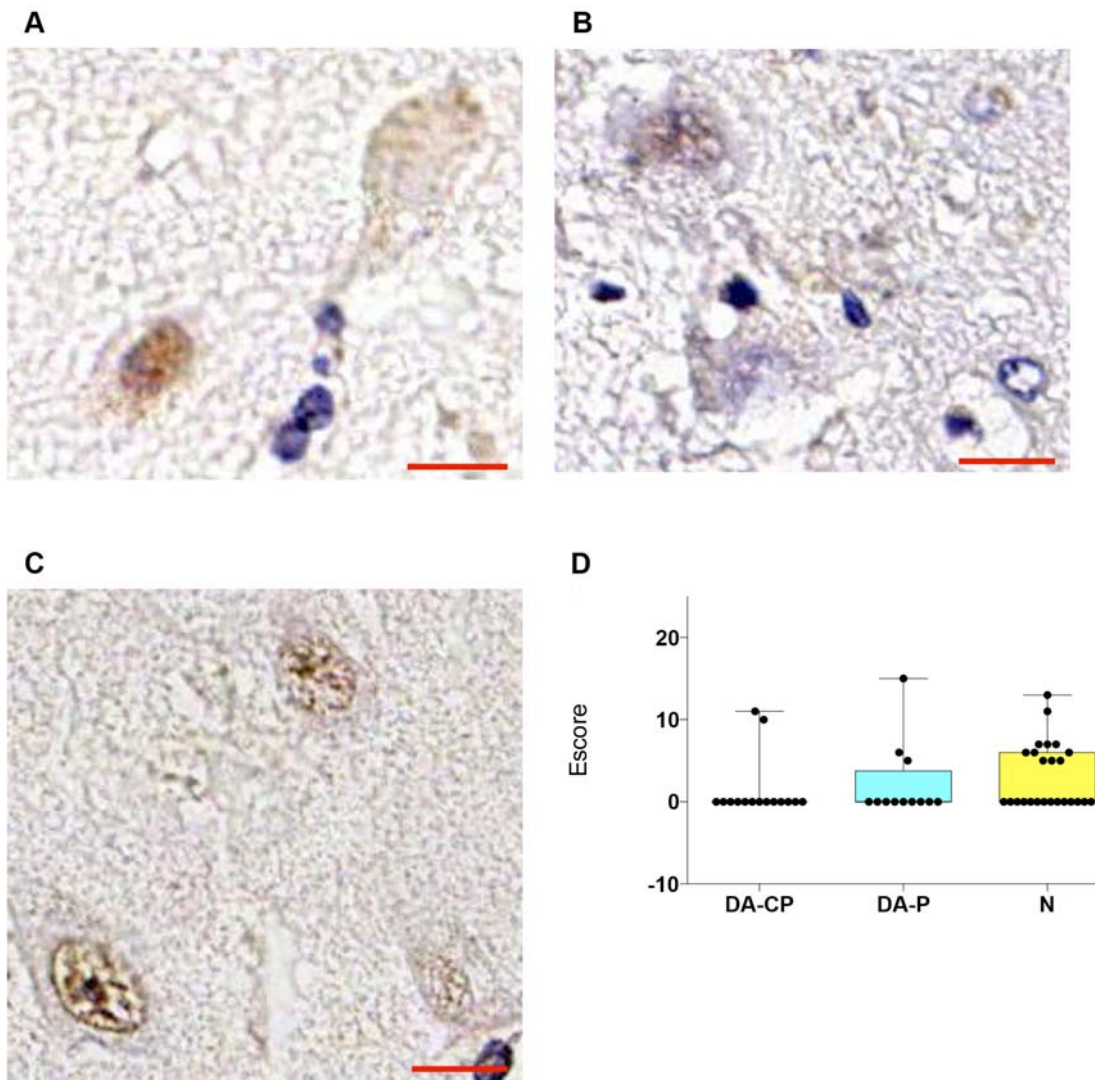


Figura 15 - Padrão de expressão citoplasmática do marcador Rb no hipocampo de indivíduos com DA-CP (A), DA-P (B) e sujeitos normais (C) com os respectivos níveis de expressão (D). DA-CP, doença de Alzheimer clínico-patológica; DA-P, doença de Alzheimer patológica; N, envelhecimento normal. Barra de escala: 50 μm.

Tabela 7 - Estatística descritiva referente à expressão de Rb no hipocampo.

	Núcleo			Citoplasma		
	DA-CP	DA-P	N	DA-CP	DA-P	N
Número de amostras	15	12	25	15	12	25
Mínimo	0	0	0	0	0	0
Percentil 25%	6	6	6	0	0	0
Mediana	11	12	12	0	0	0
Percentil 75%	13	12.75	17	0	3.75	6
Máximo	17	23	23	11	15	13
Média	9.733	10.08	11.44	1.4	2.167	3.12
Desvio padrão	4.267	6.598	5.803	3.699	4.569	3.961

Para verificar a significância estatística das diferenças encontradas foi realizado o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn (Tabela 8).

Tabela 8 - Testes estatísticos para verificar significância da expressão de Rb no hipocampo.

	P-valor (Núcleo)	P-valor (Citoplasma)
Kruskal-Wallis	0.6395	0.1907
Dunn		
DA-CP vs. DA-P	> 0.9999	> 0.9999
DA-CP vs. N	> 0.9999	0.2391
DA-P vs. N	> 0.9999	0.8509

Não houve diferença estatisticamente significativa quanto à expressão da Rb em nenhuma das localizações subcelulares analisadas (núcleo e citoplasma).

Em seguida encontram-se os resultados da Rb fosforilada (fosfo-RB) no hipocampo (Figuras 16 e 17, Tabelas 9 e 10).

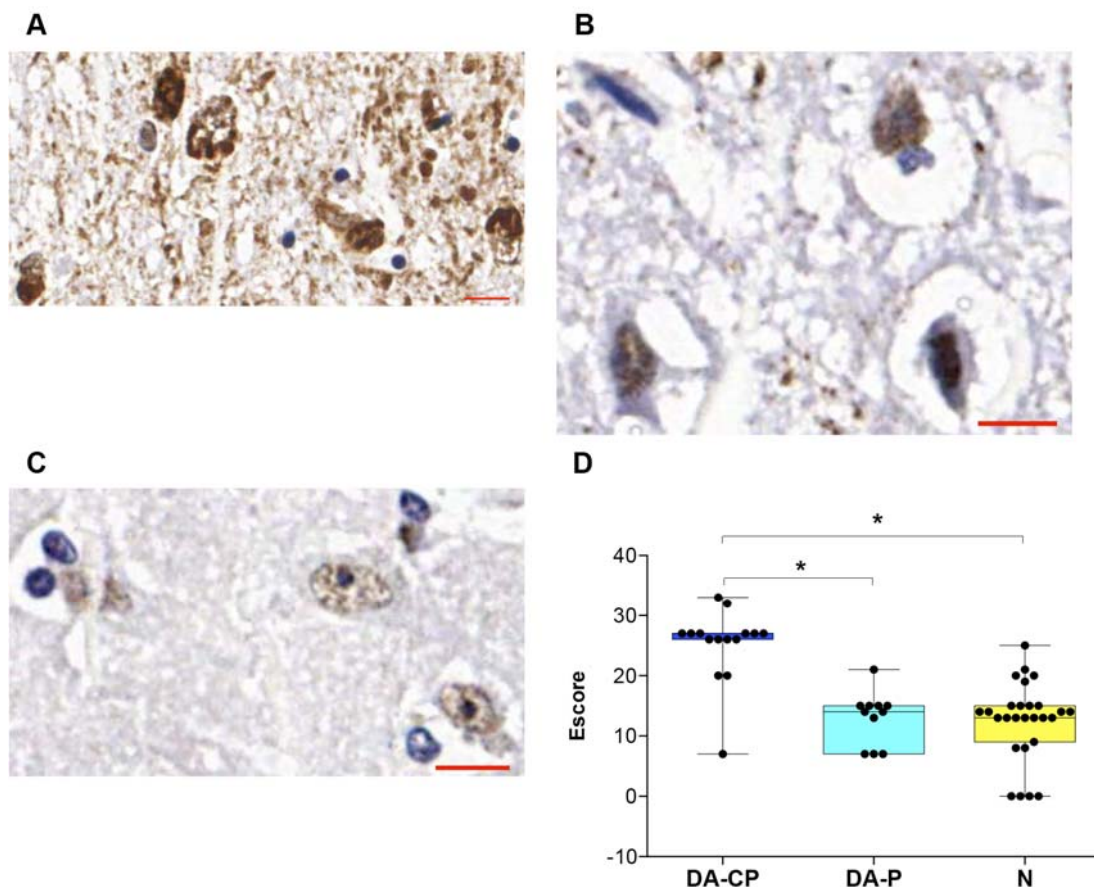


Figura 16 - Padrão de expressão nuclear do marcador fosfo-Rb no hipocampo de indivíduos com DA-CP (A), DA-P (B) e sujeitos normais (C) com os respectivos níveis de expressão (D). DA-CP, doença de Alzheimer clínico-patológica; DA-P, doença de Alzheimer patológica; N, envelhecimento normal. Barra de escala: 50 μ m. *, indica significância estatística ($P < 0,05$).

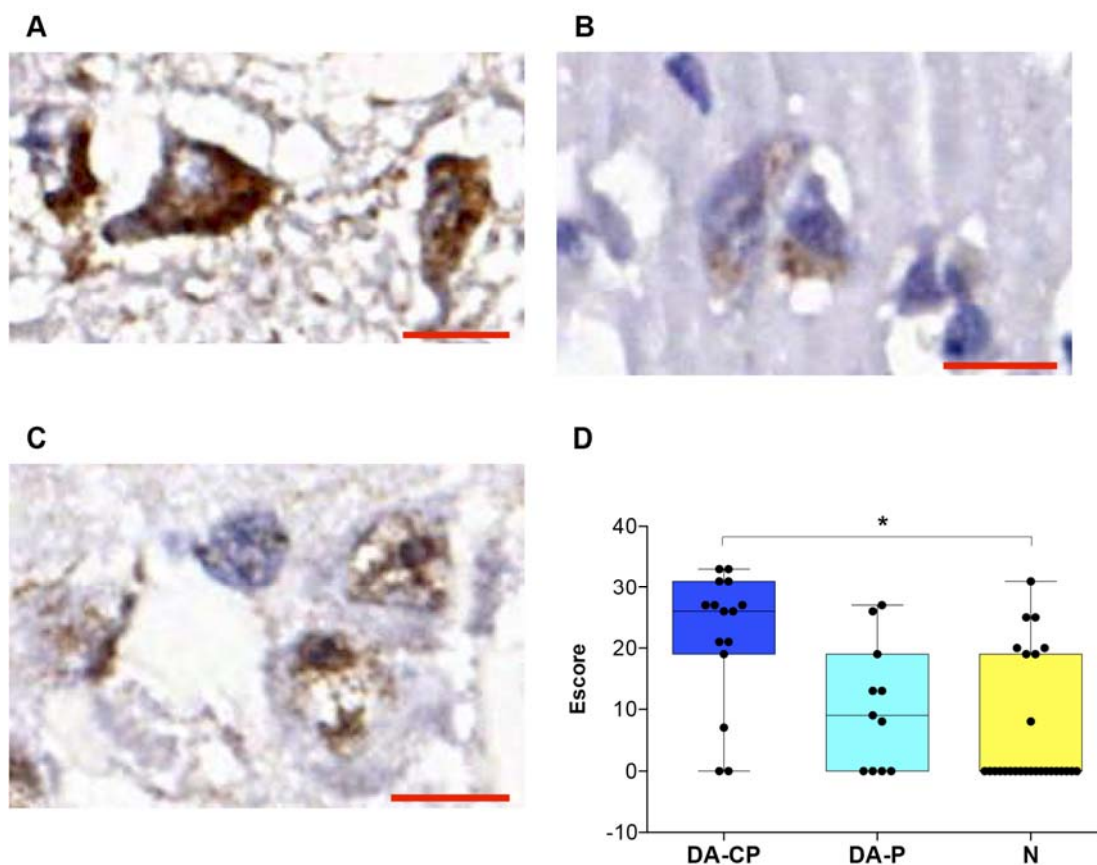


Figura 17 - Padrão de expressão citoplasmática do marcador fosfo-Rb no hipocampo de indivíduos com DA-CP (A), DA-P (B) e sujeitos normais (C) com os respectivos níveis de expressão (D). DA-CP, doença de Alzheimer clínico-patológica; DA-P, doença de Alzheimer patológica; N, envelhecimento normal. Barra de escala: 50 μm. *, indica significância estatística ($P < 0,05$).

Tabela 9 - Estatística descritiva referente à expressão de Rb fosforilada no hipocampo.

	Núcleo			Citoplasma		
	DA-CP	DA-P	N	DA-CP	DA-P	N
Número de amostras	15	11	27	15	11	27
Mínimo	7	7	0	0	0	0
Percentil 25%	26	7	9	19	0	0
Mediana	27	14	13	26	9	0
Percentil 75%	27	15	15	31	19	19
Máximo	33	21	25	33	27	31
Média	25.2	13	12.48	21.93	10.45	6.185
Desvio padrão	6.062	4.359	6.495	11.07	10.23	10.31

Para verificar a significância estatística das diferenças encontradas, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn (Tabela 10).

Tabela 10 - Testes estatísticos para verificar significância da expressão de Rb fosforilada no hipocampo.

	P-valor (Núcleo)	P-valor (Citoplasma)
Kruskal-Wallis	< 0.0001*	0.0002*
Dunn		
DA-CP vs. DA-P	0.0011*	0.0768
DA-CP vs. N	< 0.0001*	0.0001*
DA-P vs. N	> 0.9999	0.6641

*, indica significância estatística ($P < 0,05$).

Assim, em relação à análise nuclear, a maior expressão de ppRb observada nos indivíduos com DA-CP foi estatisticamente significativa quando comparada com a expressão nos grupos DA-P e N. Não houve diferença significativa na comparação entre DA-P e N.

Quanto à análise citoplasmática, somente houve diferença estatisticamente significativa relacionada a maior expressão de ppRb nos indivíduos com DA sintomática (DA-CP) quando comparados com os sujeitos com envelhecimento normal (N).

4.2.4 E2f1

A proteína E2f1 é um fator de transcrição que exerce papel crucial no controle do ciclo celular. Esta proteína liga-se preferencialmente a proteína retinoblastoma (Rb) e pode mediar tanto a proliferação celular quanto a apoptose.

Abaixo, encontram-se os resultados da proteína E2f1 no hipocampo (Figuras 18 e 19, Tabelas 11 e 12).

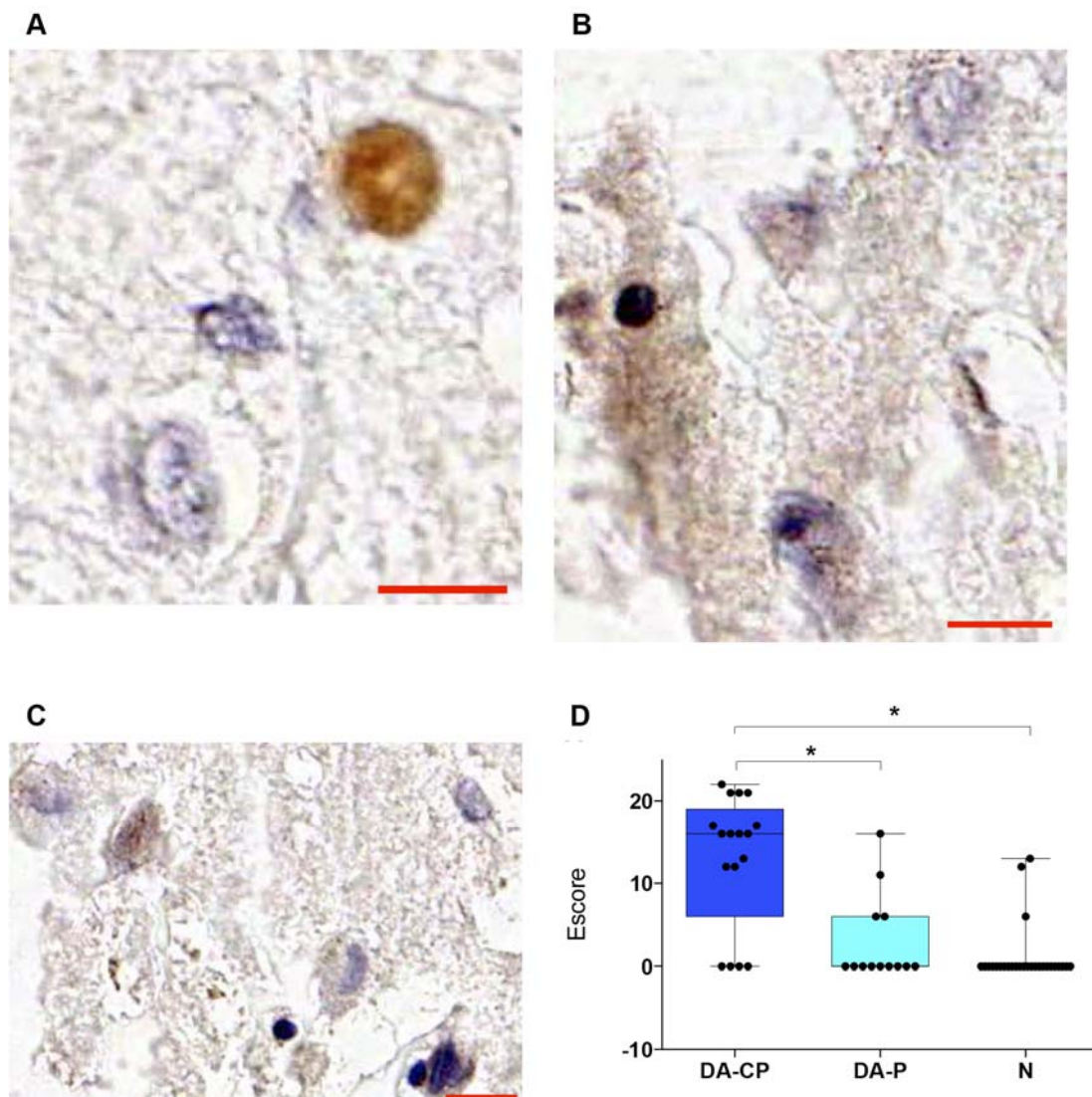


Figura 18 - Padrão de expressão nuclear do marcador E2F1 no hipocampo de indivíduos com DA-CP (A), DA-P (B) e sujeitos normais (C) com os respectivos níveis de expressão (D). DA-CP, doença de Alzheimer clínico-patológica; DA-P, doença de Alzheimer patológica; N, envelhecimento normal. Barra de escala: 50 μ m. *, indica significância estatística ($P < 0,05$).

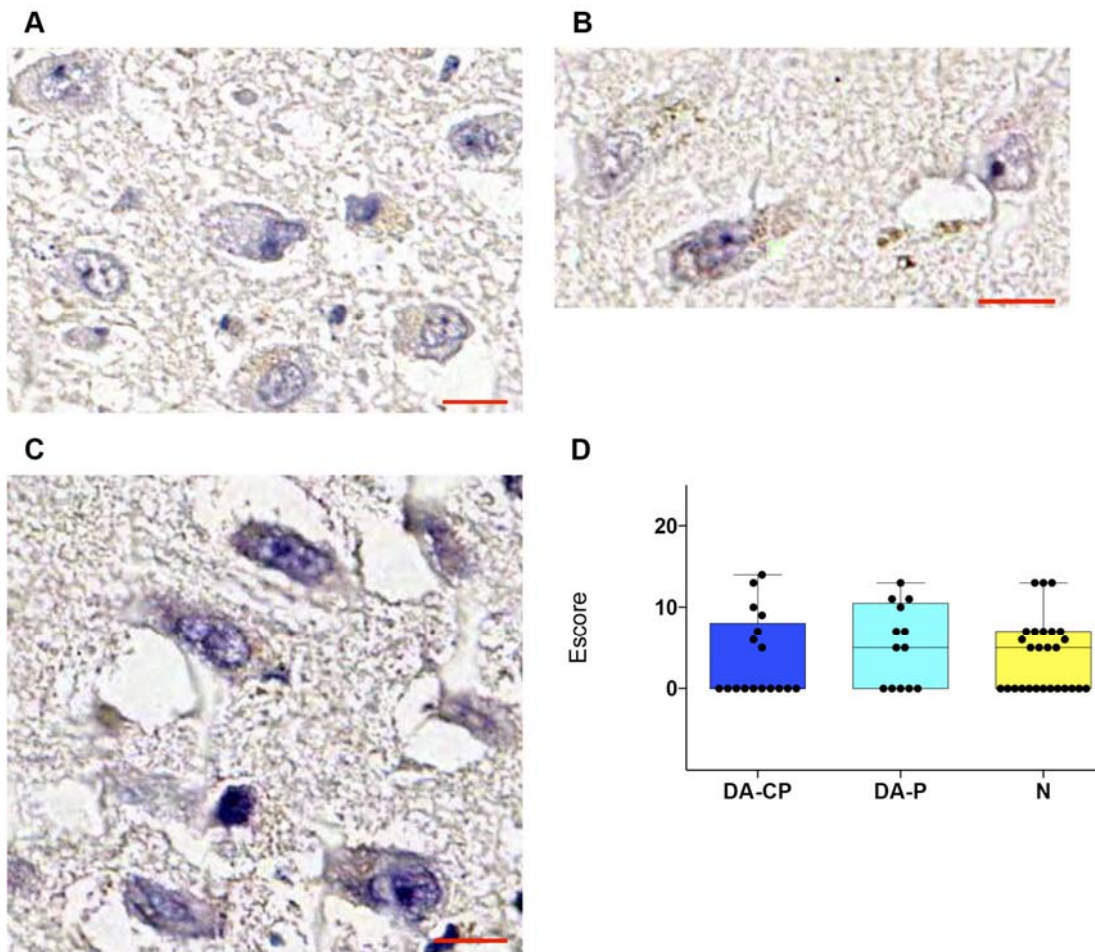


Figura 19 - Padrão de expressão citoplasmática do marcador E2F1 no hipocampo de indivíduos com DA-CP (A), DA-P (B) e sujeitos normais (C) com os respectivos níveis de expressão (D). DA-CP, doença de Alzheimer clínico-patológica; DA-P, doença de Alzheimer patológica; N, envelhecimento normal. Barra de escala: 50 μ m.

Tabela 11 - Estatística descritiva referente à expressão de E2F1 no hipocampo.

	Núcleo			Citoplasma		
	DA-CP	DA-P	N	DA-CP	DA-P	N
Número de amostras	17	13	27	17	13	27
Mínimo	0	0	0	0	0	0
Percentil 25%	6	0	0	0	0	0
Mediana	16	0	0	0	5	5
Percentil 75%	19	6	0	8	10.5	7
Máximo	22	16	13	14	13	13
Média	12.94	3	1.148	3.765	5.308	3.926
Desvio padrão	7.98	5.26	3.472	5.093	4.939	4.42

Para verificar a significância estatística das diferenças encontradas foi realizado o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn (Tabela 12).

Tabela 12 - Testes estatísticos para verificar significância da expressão de E2F1 no hipocampo.

	P-valor (Núcleo)	P-valor (Citoplasma)
Kruskal-Wallis	< 0.0001*	0.6056
Dunn		
DA-CP vs. DA-P	0.0036*	> 0.9999
DA-CP vs. N	< 0.0001*	> 0.9999
DA-P vs. N	> 0.9999	> 0.9999

*, indica significância estatística ($P < 0,05$).

Portanto, em relação à análise nuclear, a maior expressão de E2f1 observada nos indivíduos com DA-CP foi estatisticamente significante quando comparada com a expressão nos grupos DA-P e N. Não houve diferença significante na comparação entre DA-P e N.

Quanto à análise citoplasmática, não houve diferença estatisticamente significante relacionada a expressão de E2f1 nos 3 grupos do estudo.

4.2.5 Cdk1

Cdk1, também conhecida como Cdc2, é uma subunidade catalítica de um complexo de proteico, chamado fator promotor da fase M (FPM), que induz a entrada na fase de mitose.

Em seguida, encontram-se os resultados de expressão de Cdk1 no núcleo (Figura 20) e citoplasma (Figura 21) do hipocampo (Tabelas 13 e 14).

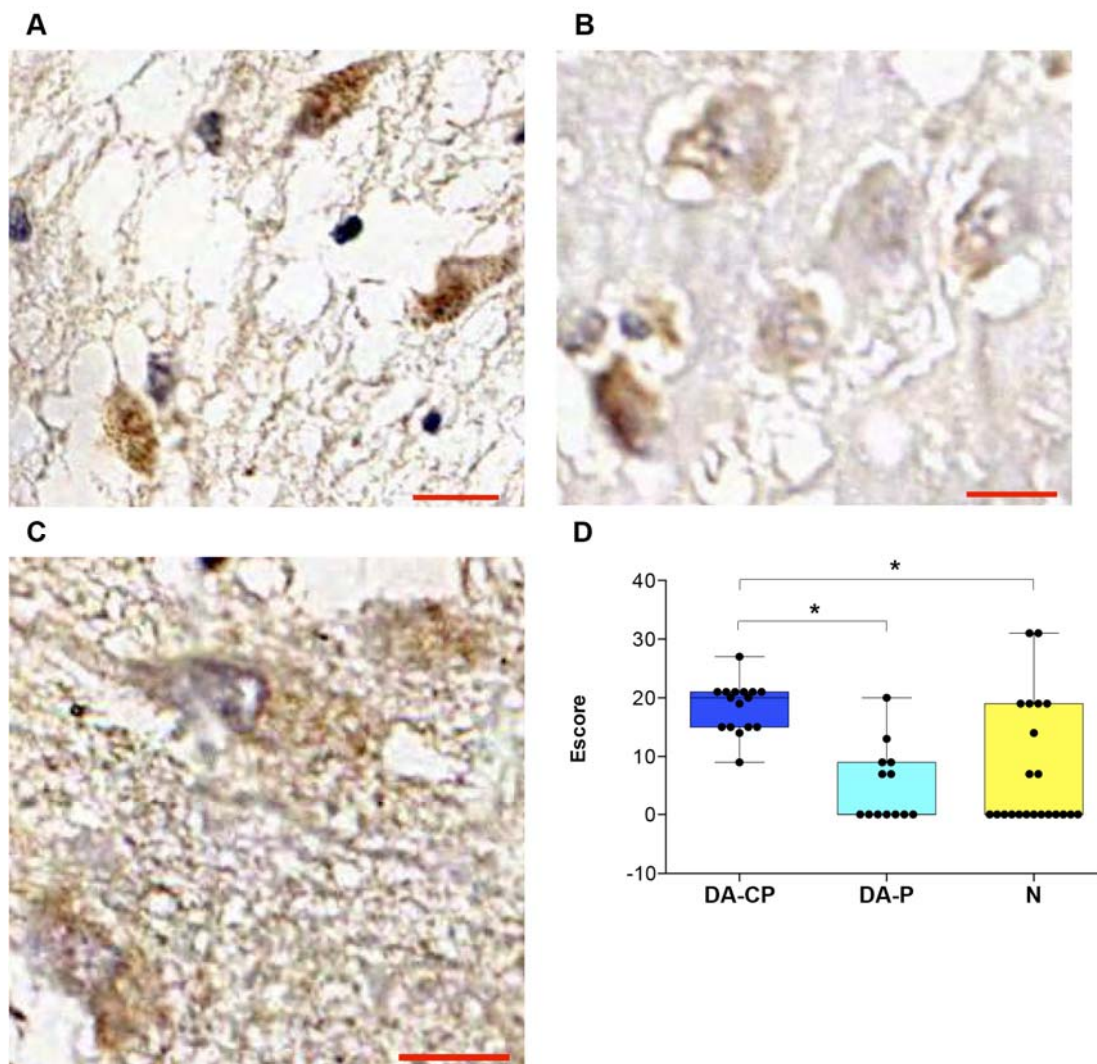


Figura 20 - Padrão de expressão nuclear do marcador Cdk1 no hipocampo de indivíduos com DA-CP (A), DA-P (B) e sujeitos normais (C) com os respectivos níveis de expressão (D). DA-CP, doença de Alzheimer clínico-patológica; DA-P, doença de Alzheimer patológica; N, envelhecimento normal. Barra de escala: 50 μ m. *, indica significância estatística ($P < 0,05$).

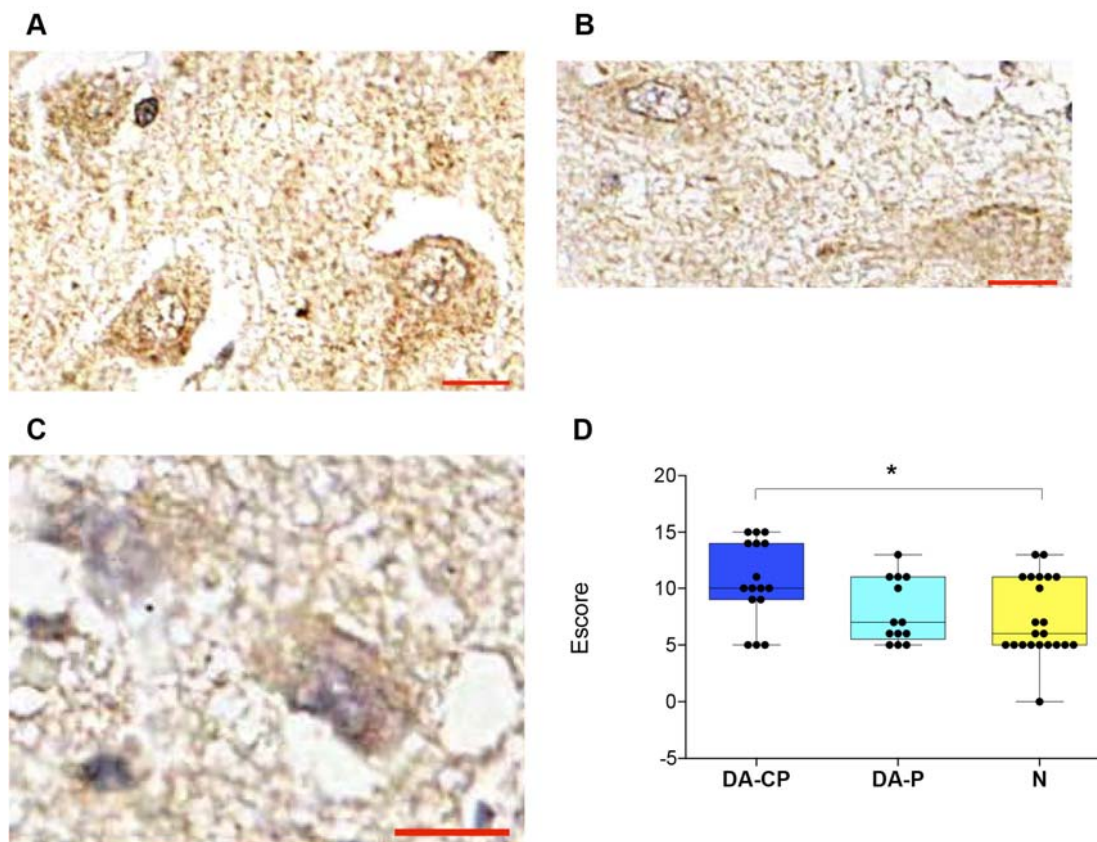


Figura 21 - Padrão de expressão citoplasmática do marcador Cdk1 no hipocampo de indivíduos com DA-CP (A), DA-P (B) e sujeitos normais (C) com os respectivos níveis de expressão (D). DA-CP, doença de Alzheimer clínico-patológica; DA-P, doença de Alzheimer patológica; N, envelhecimento normal. Barra de escala: 50 μ m. *, indica significância estatística ($P < 0,05$).

Tabela 13 - Estatística descritiva referente à expressão de Cdk1 no hipocampo.

	Núcleo			Citoplasma		
	DA-CP	DA-P	N	DA-CP	DA-P	N
Número de amostras	16	13	22	16	13	22
Mínimo	9	0	0	5	5	0
Percentil 25%	15	0	0	9	5.5	5
Mediana	20	0	0	10	7	6
Percentil 75%	21	9	19	14	11	11
Máximo	27	20	31	15	13	13
Média	18.44	5	7.545	10.69	7.923	7.364
Desvio padrão	4.273	6.481	10.71	3.591	2.842	3.416

Para verificar a significância estatística das diferenças encontradas foi realizado o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn (Tabela 14).

Tabela 14 - Testes estatísticos para verificar significância da expressão de Cdk1 no hipocampo.

	P-valor (Núcleo)	P-valor (Citoplasma)
Kruskal-Wallis	< 0.0001*	0.0503*
Dunn		
DA-CP vs. DA-P	0.0003*	0.3435
DA-CP vs. N	0.0003*	0.0478*
DA-P vs. N	> 0.9999	> 0.9999

*, indica significância estatística ($P < 0,05$).

Portanto, em relação à análise nuclear, a maior expressão de Cdk1 observada nos indivíduos com DA-CP foi estatisticamente significativa quando comparada com a expressão nos grupos DA-P e N. Não houve diferença significativa na comparação entre DA-P e N.

Quanto à análise citoplasmática, somente houve diferença estatisticamente significativa relacionada a maior expressão de Cdk1 nos indivíduos com DA sintomática (DA-CP) quando comparados com os sujeitos com envelhecimento normal (N).

4.2.6 Ciclina B1

A proteína ciclina B1 é expressa predominantemente na fase G2/M do ciclo celular, interagindo com Cdk1 para formar o fator promotor da fase M (FPM).

Os resultados da expressão de ciclina B nos três grupos desse estudo estão mostrados a seguir (Figuras 22 e 23, Tabelas 15 e 16).

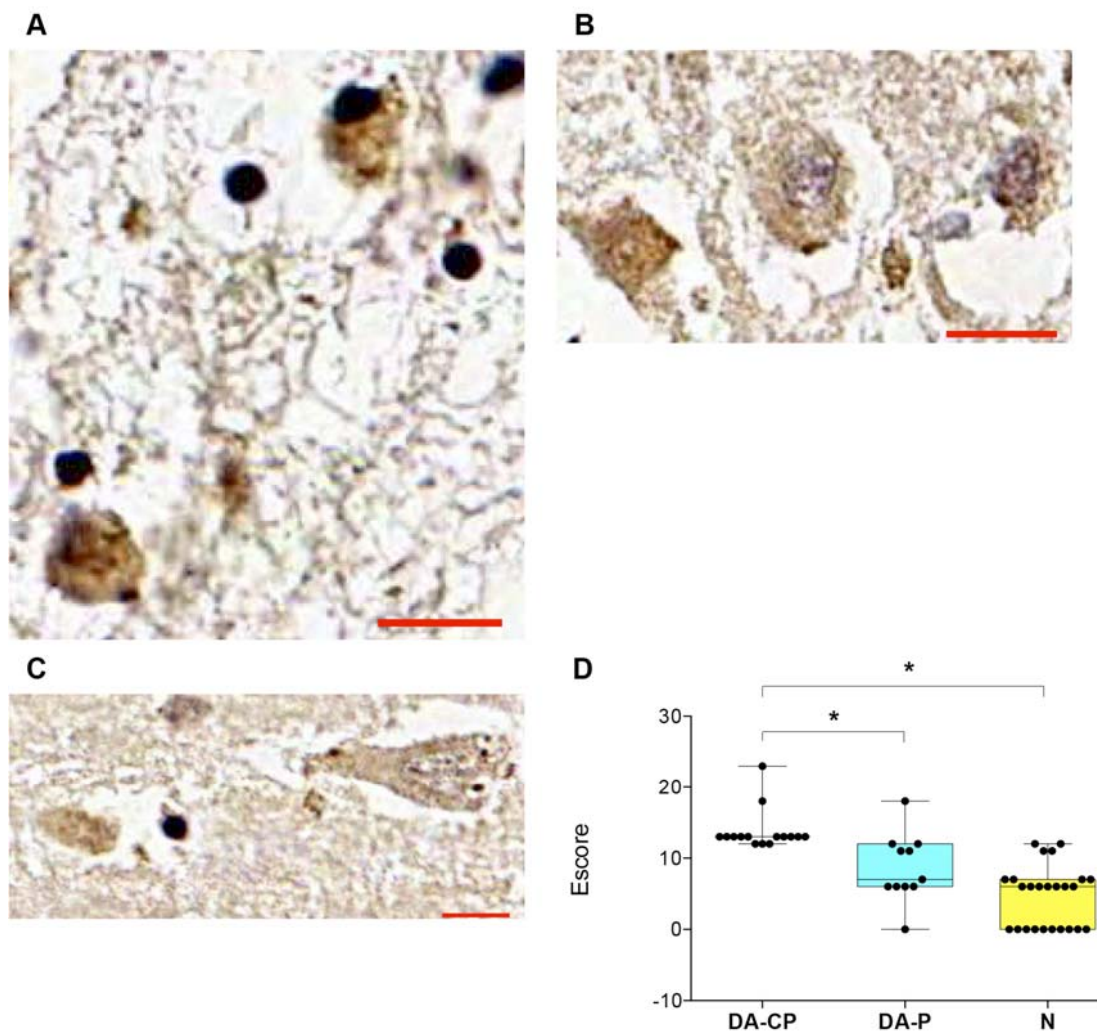


Figura 22 - Padrão de expressão nuclear do marcador ciclina B no hipocampo de indivíduos com DA-CP (A), DA-P (B) e sujeitos normais (C) com os respectivos níveis de expressão (D). DA-CP, doença de Alzheimer clínico-patológica; DA-P, doença de Alzheimer patológica; N, envelhecimento normal. Barra de escala: 50 μm. *, indica significância estatística ($P < 0,05$).

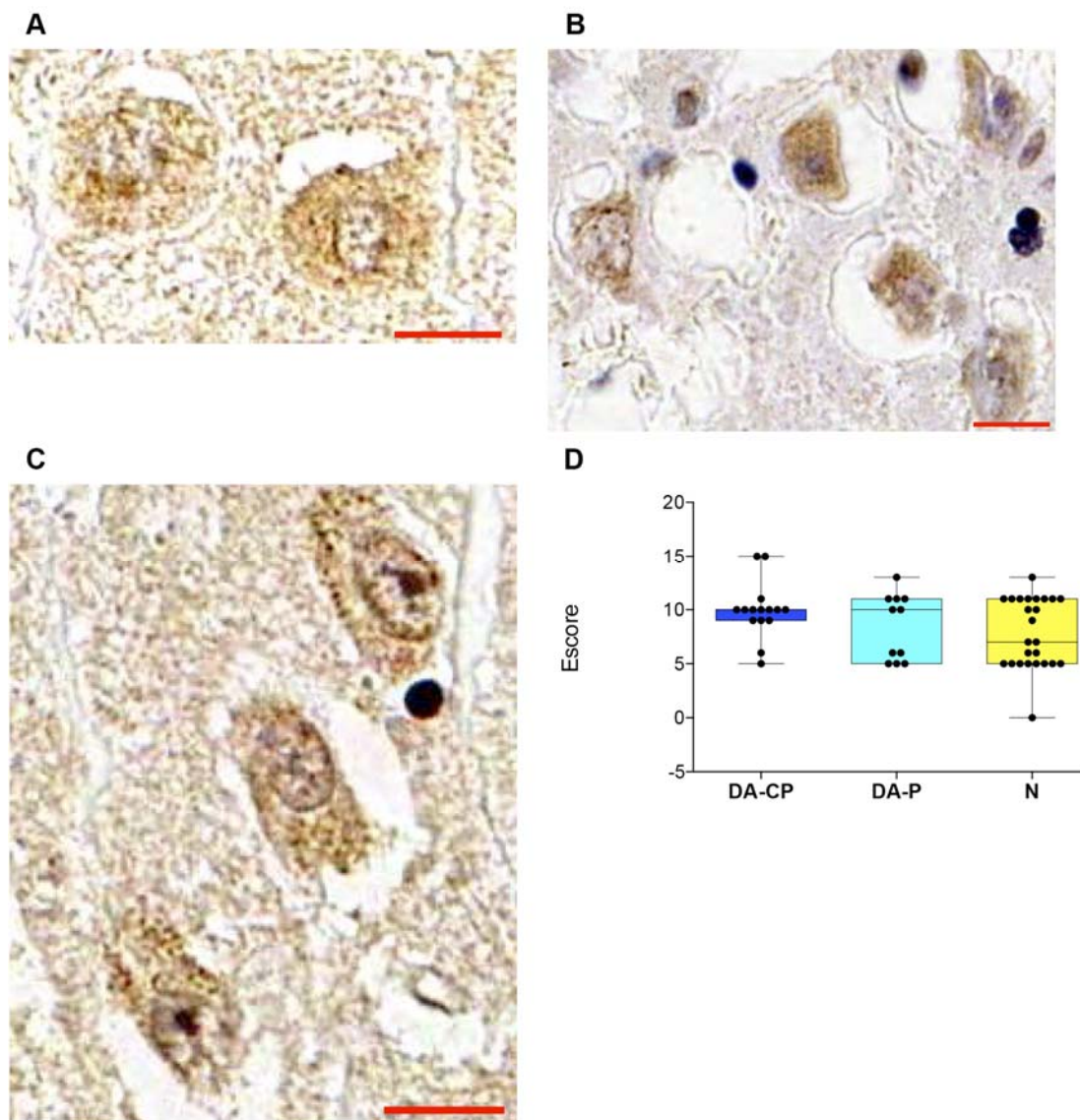


Figura 23 - Padrão de expressão citoplasmática do marcador ciclina B no hipocampo de indivíduos com DA-CP (A), DA-P (B) e sujeitos normais (C) com os respectivos níveis de expressão (D). DA-CP, doença de Alzheimer clínico-patológica; DA-P, doença de Alzheimer patológica; N, envelhecimento normal. Barra de escala: 50 μ m.

Tabela 15 - Estatística descritiva referente à expressão de ciclina B1 no hipocampo.

	Núcleo			Citoplasma		
	DA-CP	DA-P	N	DA-CP	DA-P	N
Número de amostras	15	11	25	15	11	25
Mínimo	12	0	0	5	5	0
Percentil 25%	13	6	0	9	5	5
Mediana	13	7	6	10	10	7
Percentil 75%	13	12	7	10	11	11
Máximo	23	18	12	15	13	13
Média	13.8	8.636	4.64	9.933	8.455	7.84
Desvio padrão	2.908	4.76	4.281	2.604	3.045	3.236

Para verificar a significância estatística das diferenças encontradas foi realizado o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn (Tabela 16).

Tabela 16 - Testes estatísticos para verificar significância da expressão de ciclina B1 no hipocampo.

	P-valor (Núcleo)	P-valor (Citoplasma)
Kruskal-Wallis	< 0.0001*	0.4803
Dunn		
DA-CP vs. DA-P	0.0079*	> 0.9999
DA-CP vs. N	< 0.0001*	0.6784
DA-P vs. N	0.2776	> 0.9999

*, indica significância estatística ($P < 0,05$).

Portanto, em relação à análise nuclear, a maior expressão de ciclina B observada nos indivíduos com DA-CP foi estatisticamente significativa quando comparada com a expressão nos grupos DA-P e N. Não houve diferença significativa na comparação entre DA-P e N.

Quanto à análise citoplasmática, não houve diferença estatisticamente significativa relacionada à expressão de ciclina B nos indivíduos dos 3 grupos do estudo.

4.2.7 p27^{Kip1}

Esta proteína é uma inibidora de CDK que se liga e impede a ativação dos complexos CDK2-ciclina E ou Cdk4-ciclina D controlando, então, a progressão do ciclo celular em G1. A degradação desta proteína é requerida para a transição do estado quiescente para o proliferativo.

Os resultados de expressão de p27 estão apresentados a seguir (Figuras 24 e 25, Tabelas 17 e 18).

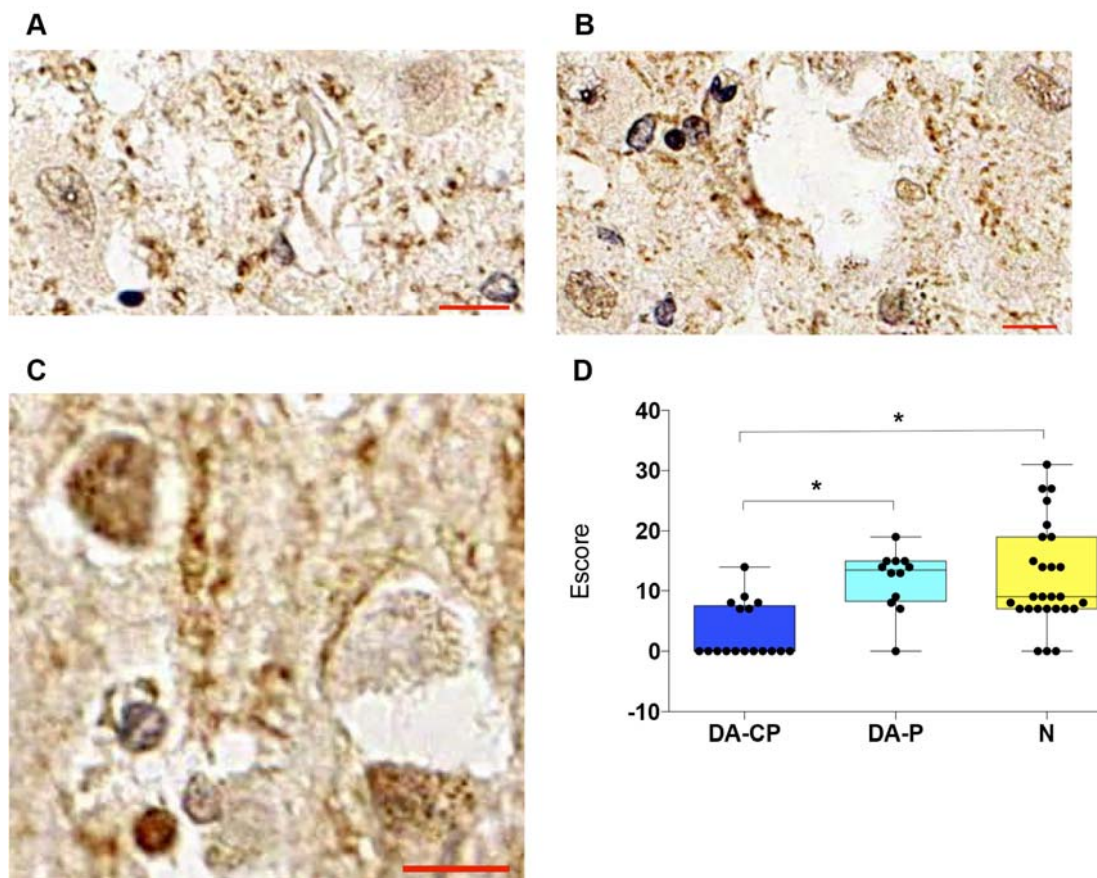


Figura 24 - Padrão de expressão nuclear do marcador p27 no hipocampo de indivíduos com DA-CP (**A**), DA-P (**B**) e sujeitos normais (**C**) com os respectivos níveis de expressão (**D**). DA-CP, doença de Alzheimer clínico-patológica; DA-P, doença de Alzheimer patológica; N, envelhecimento normal. Barra de escala: 50 μ m. *, indica significância estatística ($P < 0,05$).

Tabela 17 - Estatística descritiva referente à expressão de p27 no hipocampo.

	Núcleo			Citoplasma		
	DA-CP	DA-P	N	DA-CP	DA-P	N
Número de amostras	17	12	27	17	11	27
Mínimo	0	0	0	0	0	0
Percentil 25%	0	8.25	7	0	0	0
Mediana	0	13.5	9	0	0	0
Percentil 75%	7.5	15	19	0	0	0
Máximo	14	19	31	0	6	7
Média	3.118	11.83	12.11	0	0.5455	0.7778
Desvio padrão	4.595	5.042	8.446	0	1.809	1.948

Para verificar a significância estatística das diferenças encontradas foi realizado o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn (Tabela 18).

Tabela 18 - Testes estatísticos para verificar significância da expressão de p27 no hipocampo.

	P-valor (Núcleo)	P-valor (Citoplasma)
Kruskal-Wallis	0.0002*	0.2638
Dunn		
DA-CP vs. DA-P	0.0015*	> 0.9999
DA-CP vs. N	0.0009*	0.3082
DA-P vs. N	> 0.9999	> 0.9999

*, indica significância estatística ($P < 0,05$).

Portanto, em relação à análise nuclear, a menor expressão de p27 observada nos indivíduos com DA-CP foi estatisticamente significativa quando comparada com a expressão nos grupos DA-P e N. Não houve diferença significativa na comparação entre DA-P e N.

Quanto à análise citoplasmática, a expressão de p27 é praticamente nula, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

4.2.8 Cdk5

Cdk5 é uma CDK que está ativa em neurônios pós-mitóticos. Uma importante função da Cdk5 inclui a regulação da migração e maturação de neurônios durante o desenvolvimento. Havia pouca evidência indicativa de um papel desta proteína na regulação do ciclo celular, entretanto, recentes dados sugerem que Cdk5 exerce um papel crucial como supressor do ciclo celular em neurônios. Assim, resolvemos avaliá-la em nossas amostras (Figuras 26 e 27, Tabelas 19 e 20).

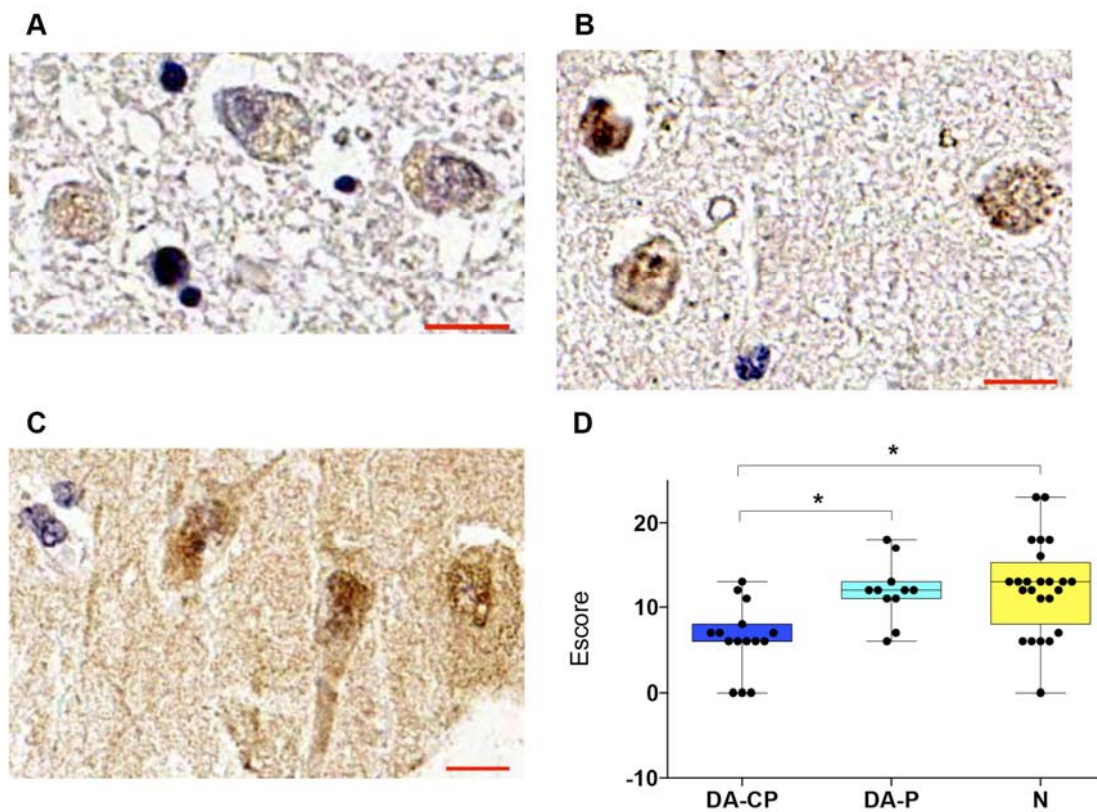


Figura 26 - Padrão de expressão nuclear do marcador Cdk5 no hipocampo de indivíduos com DA-CP (A), DA-P (B) e sujeitos normais (C) com os respectivos níveis de expressão (D). DA-CP, doença de Alzheimer clínico-patológica; DA-P, doença de Alzheimer patológica; N, envelhecimento normal. Barra de escala: 50 μ m. *, indica significância estatística ($P < 0,05$).

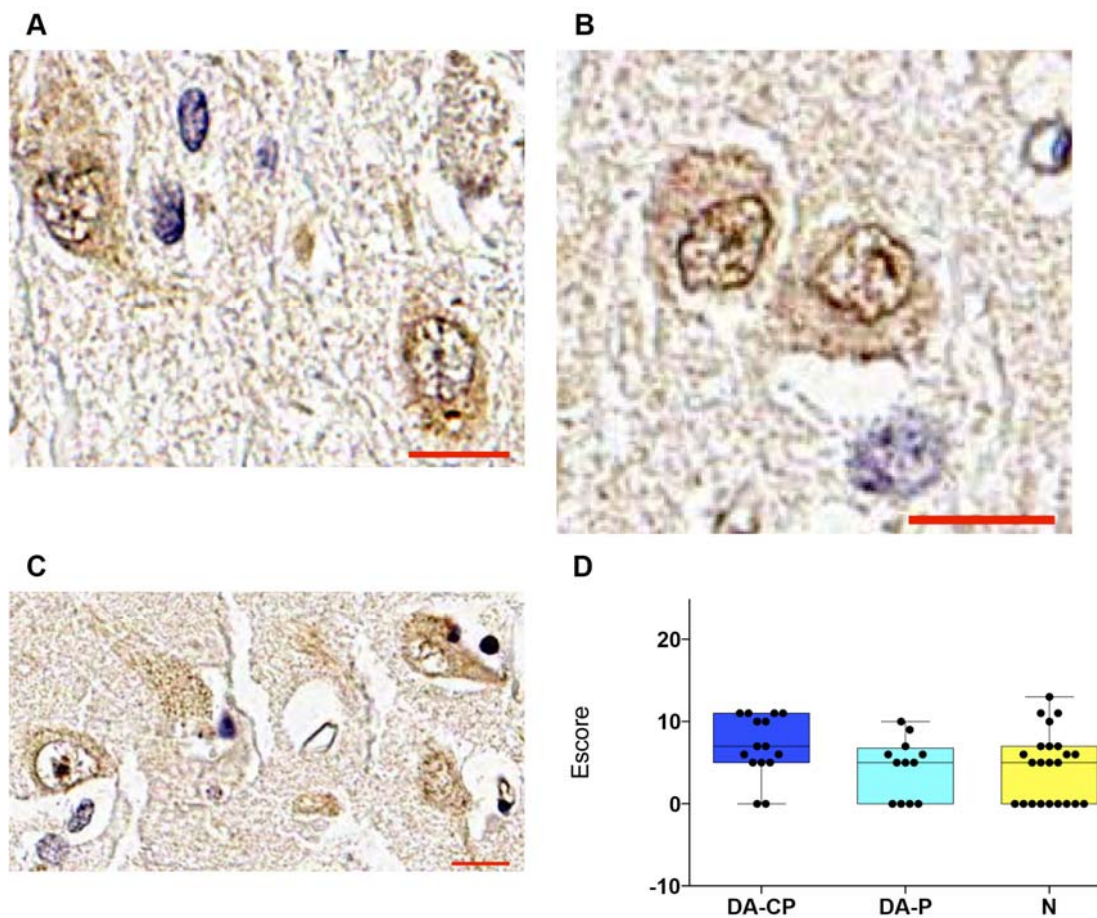


Figura 27 - Padrão de expressão citoplasmática do marcador Cdk5 no hipocampo de indivíduos com DA-CP (A), DA-P (B) e sujeitos normais (C) com os respectivos níveis de expressão (D). DA-CP, doença de Alzheimer clínico-patológica; DA-P, doença de Alzheimer patológica; N, envelhecimento normal. Barra de escala: 50 μ m. *, indica significância estatística ($P < 0,05$).

Tabela 19 - Estatística descritiva referente à expressão de Cdk5 no hipocampo.

	Núcleo			Citoplasma		
	DA-CP	DA-P	N	DA-CP	DA-P	N
Número de amostras	15	11	24	15	12	23
Mínimo	0	6	0	0	0	0
Percentil 25%	6	11	8	5	0	0
Mediana	6	12	13	7	5	5
Percentil 75%	8	13	15.25	11	6.75	7
Máximo	13	18	23	11	10	13
Média	6.333	11.91	12.33	7	4.417	4.522
Desvio padrão	3.994	3.534	5.459	3.723	3.605	4.241

Para verificar a significância estatística das diferenças encontradas foi realizado o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn (Tabela 20).

Tabela 20 - Testes estatísticos para verificar significância da expressão de Cdk5 no hipocampo.

	P-valor (Núcleo)	P-valor (Citoplasma)
Kruskal-Wallis	0.0017*	0.1306
Dunn		
DA-CP vs. DA-P	0.033*	0.2665
DA-CP vs. N	0.0017*	0.2115
DA-P vs. N	> 0.9999	> 0.9999

*, indica significância estatística ($P < 0,05$).

Portanto, em relação à análise nuclear, a menor expressão de Cdk5 observada nos indivíduos com DA-CP foi estatisticamente significativa quando comparada com a expressão nos grupos DA-P e N. Não houve diferença significativa na comparação entre DA-P e N.

Quanto à análise citoplasmática, não houve diferença estatisticamente significativa relacionada à expressão de Cdk5 entre os grupos do estudo, apesar da aparente tendência de uma maior expressão em neurônios do grupo DA-CP.

4.3 MORTE CELULAR

4.3.1 Detecção de apoptose baseada na técnica de TUNEL

A expressão alterada de muitas proteínas relacionadas ao ciclo celular e o consequente controle inapropriado deste evento em neurônios têm sido fortemente associados à morte celular (YANG e HERRUP 2007).

Abaixo, encontram-se os resultados da avaliação da apoptose nos três grupos do estudo (Figura 28, Tabelas 21 e 22) através de um experimento que detecta DNA fragmentado, um dos estágios apoptóticos.

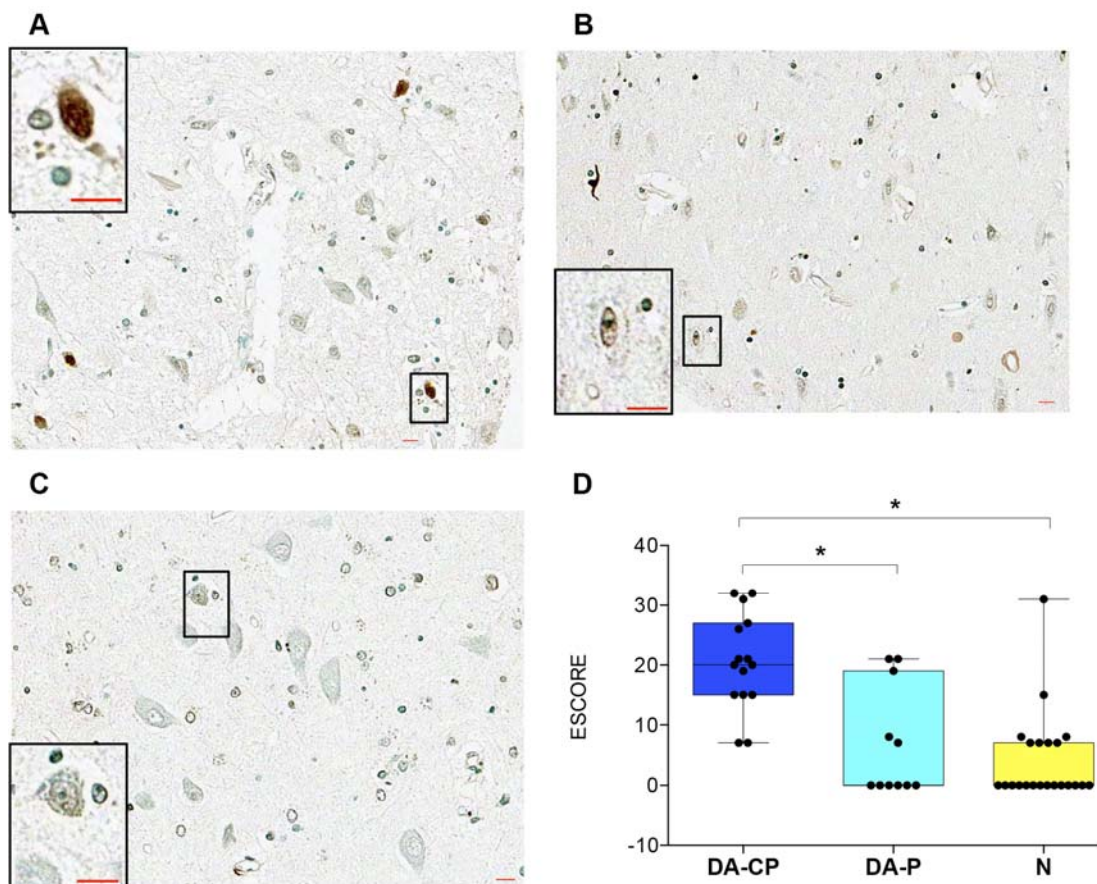


Figura 28 - Avaliação de morte celular no hipocampo de indivíduos com DA-CP (A), DA-P (B) e sujeitos normais (C) com os respectivas quantificações (D). DA-CP, doença de Alzheimer clínico-patológica; DA-P, doença de Alzheimer patológica; N, envelhecimento normal. Barra de escala: 50 µm. *, indica significância estatística ($P < 0,05$).

Tabela 21 - Estatística descritiva referente à morte celular no hipocampo.

	DA-CP	DA-P	N
Número de amostras	15	11	22
Mínimo	7	0	0
Percentil 25%	15	0	0
Mediana	20	0	0
Percentil 75%	27	19	7
Máximo	32	21	31
Média	20.53	6.909	4.091
Desvio padrão	8.043	9.115	7.374

Para verificar a significância estatística das diferenças encontradas foi realizado o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn (Tabela 22).

Tabela 22 - Testes estatísticos para verificar significância de morte celular no hipocampo.

	P-valor
Kruskal-Wallis	< 0.0001*
Dunn	
DA-CP vs. DA-P	0.0061*
DA-CP vs. N	< 0.0001*
DA-P vs. N	> 0.9999

*, indica significância estatística ($P < 0,05$).

Portanto, a maior quantidade de morte neuronal encontrada nos indivíduos com DA-CP é estatisticamente significativa quando comparada com os grupos DA-P e N. Não houve diferença significativa na comparação entre DA-P e N.

4.4 CLUSTERIZAÇÃO HIERÁRQUICA

Com os valores de expressão obtidos através dos marcadores de ciclo (expressão nuclear) e morte celular foi realizada uma clusterização hierárquica com o intuito de buscar um padrão de expressão que fosse capaz de identificar clusters de amostras e/ou proteínas (Figura 29).

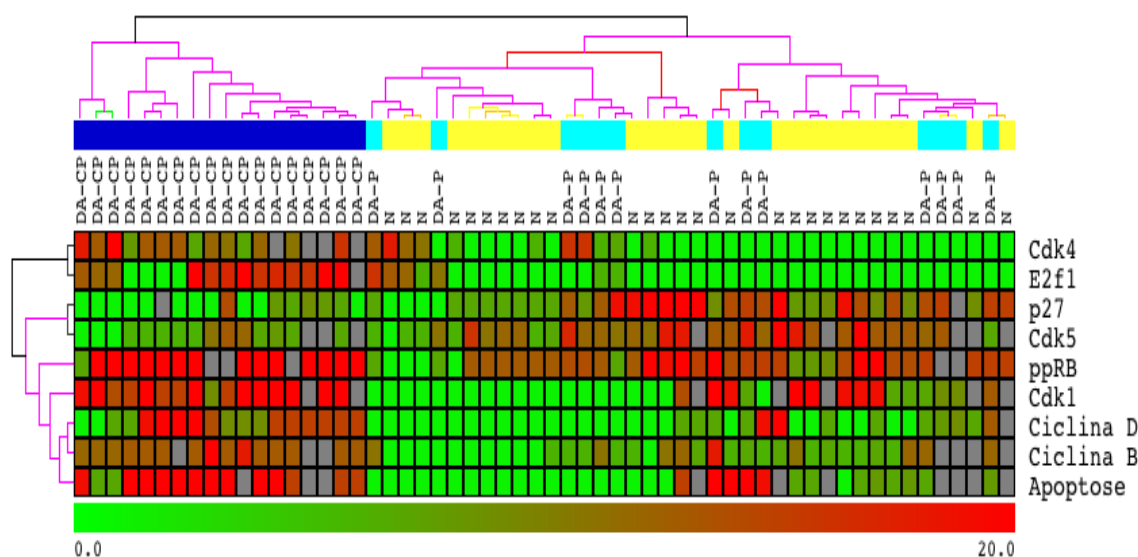


Figura 29 - Clusterização hierárquica baseada nos valores de expressão de marcadores de ciclo e morte celular nos indivíduos DA-CP, DA-P e N. Cada linha representa uma proteína e cada coluna uma amostra (azul escuro, DA-CP; azul claro, DA-P; amarelo, N). A cor verde indica baixos valores de expressão e a cor vermelha altos valores de expressão. O suporte da clusterização foi dado pela técnica de Bootstrap (a cor preta representa 100% de suporte).

Podemos observar que o padrão de expressão desses marcadores foi capaz de agrupar as amostras de DA-CP em um cluster e as amostras de DA-P e N em outro cluster com 100% de suporte.

Com essa clusterização, fica claro observar que os indivíduos DA-CP possuem alta expressão (cor vermelha) dos marcadores de progressão de ciclo (Cdk4, ciclina D, fosfo-Rb, E2f1, Cdk1, ciclina B) e morte celular e baixa expressão (cor verde) dos inibidores de ciclo celular (p27, Cdk5), enquanto que os indivíduos DA-P e N exibem baixa expressão dos marcadores de progressão de ciclo e morte celular e alta expressão dos inibidores de ciclo celular.

4.5 DUPLICAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO

4.5.1 Imuno-FISH

Além de verificar alterações no número cromossômico, o objetivo principal de se fazer FISH seria verificar se existe duplicação de DNA, uma vez que estamos estudando re-entrada no ciclo celular. Nesse contexto, é preciso ver se o aumento no número cromossômico é constitutivo ou fruto da re-entrada no ciclo. Para isso, foi executado um experimento que combina FISH (avaliação do número de cromossomos) e imunofluorescência (avaliação do marcador de ciclo celular) - Imuno-FISH.

Para tanto, foram utilizadas três sondas para os cromossomos X (verde), 18 (aqua) e 21 (vermelha), mais o marcador de ciclo celular ciclina B1 (verde). Quando as células estivessem positivas para a ciclina, o cromossomo X seria desconsiderado, já que os dois estão marcados com fluoróforos da mesma cor. O FISH,

aparentemente, tinha funcionado bem para os três cromossomos testados, mas em uma análise mais detalhada muitos *cores* ficaram sem marcação (> 60% não apresentaram sinal para as sondas utilizadas). Outro problema aconteceu com a imunofluorescência para ciclina B, pois ou ascendia em todos os núcleos, ou ficava muito fraca. A Figura 30 exemplifica a tentativa de obter as imagens do experimento de Imuno-FISH.

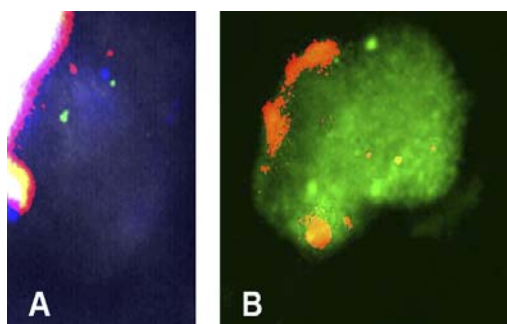


Figura 30 - Imuno-FISH. (A) Sinais obtidos pelas sondas dos cromossomos X (verde), 18 (azul) e 21 (vermelha). (B) Exemplificação de uma célula marcada com ciclina B1 (verde).

4.5.2 Imuno-CISH

Como a imuno-histoquímica funcionou para a ciclina B, ensaios de CISH (do inglês, *Chromogenic In Situ Hybridization*) combinados com imuno-histoquímica foram realizados na tentativa de avaliar a duplicação do material genético nos neurônios.

Primeiramente, foi utilizado um kit (HER2 Dual ISH assay, VENTANA[®]) que contém uma sonda que reconhece a região centromérica do cromossomo 17 (cor vermelha), e uma sonda que reconhece uma sequência do gene *HER2* (cor preta, coloração em prata). O experimento foi seguido pela imunohistoquímica para ciclina B. Porém, para análise, o gene não seria considerado, uma vez que nos interessa é o

número cromossômico. No controle positivo (tonsila), é possível observar o reconhecimento do cromossomo 17 e mais raramente do gene *HER2*, além de uma marcação de ciclina B (Figura 31A) não muito nítida. Já no cerebelo, os neurônios de Purkinje e outras células não apresentaram os sinais da sonda do cromossomo 17, nem do gene. Ainda houve uma marcação generalizada de ciclina B (não específica) (Figura 31B). Quando o CISH foi realizado isoladamente (sem imuno-histoquímica) no hipocampo, também não pode ser observada a hibridização das sondas (Figura 31C).

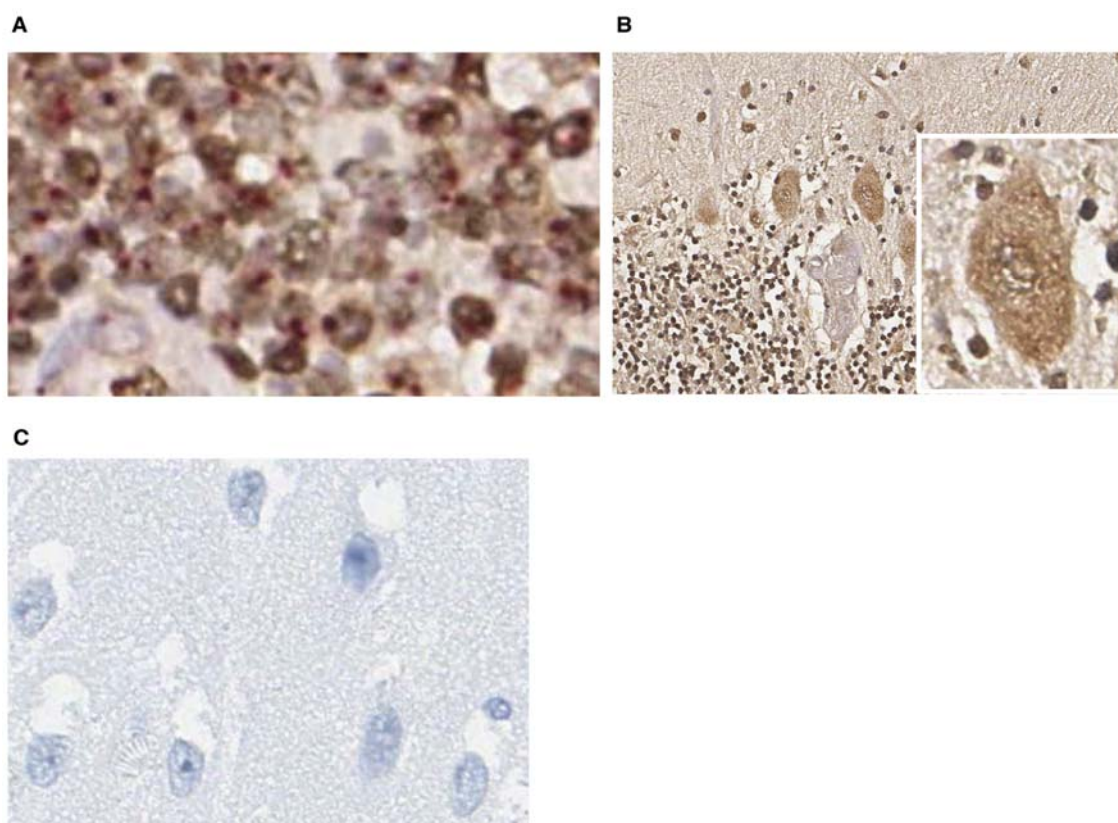


Figura 31 - Imuno-CISH. (A) CISH para o cromossomo 17 (pontos vermelhos) e para o gene *HER2* (pontos pretos) mais imuno-histoquímica para ciclina B1 (marrom) em uma tonsila. (B) CISH para o cromossomo 17 e para o gene *HER2* mais imuno-histoquímica para ciclina B1 (marrom) em um cerebelo. Em destaque, um neurônio de Purkinje mostrando que o CISH não funcionou. (C) CISH para o cromossomo 17 e para o gene *HER2* em um hipocampo.

4.6 SUMÁRIO DOS RESULTADOS

No quadro a seguir encontra-se uma síntese dos resultados obtidos pela avaliação dos marcadores do estudo no hipocampo (Quadro 4).

Quadro 4 - Sumário da avaliação dos marcadores do estudo no hipocampo.

Marcador	Núcleo			Citoplasma		
	DA-CP vs. N	DA-CP vs. DA-P	DA-P vs N	DA-CP vs. N	DA-CP vs. DA-P	DA-P vs N
CDK4	>	>	=	>	=	=
CICLINA D	>	>	=	=	=	>
Progressão do ciclo celular E2F1	>	>	=	=	=	=
CDK1	>	>	=	>	=	=
CICLINA B	>	>	=	=	=	=
ppRB	>	>	=	>	=	=
RB	=	=	=	=	=	=
Inibição do ciclo celular p27	<	<	=	=	=	=
CDK5	<	<	=	=	=	=
Morte celular APOPTOSE	>	>	=	n/a	n/a	n/a

* n/a, não aplicável

No geral, em relação à:

- **Progressão do ciclo celular**

Os indivíduos do grupo DA-CP diferem tanto do grupo DA-P quanto do grupo N, exibindo maiores níveis de expressão desses marcadores. Enquanto que os sujeitos assintomáticos (DA-P) assemelham-se aos com envelhecimento normal (N).

- **Inibição do ciclo celular**

Os indivíduos do grupo DA-CP diferem tanto do grupo DA-P quanto do grupo N, exibindo menores níveis de expressão desses marcadores. Os sujeitos assintomáticos (DA-P) assemelham-se aos com envelhecimento normal (N).

- **Morte Celular**

Os indivíduos do grupo DA-CP diferem tanto do grupo DA-P quanto do grupo N, exibindo um maior nível de morte celular. Os sujeitos assintomáticos (DA-P) assemelham-se aos com envelhecimento normal (N).

5 DISCUSSÃO

O processo neuropatológico da DA pode começar anos, se não décadas, antes do diagnóstico clínico de demência (MORRIS 2005). Aproximadamente 30% de idosos cognitivamente normais possuem algum nível da patologia típica da DA, e muitos desses indivíduos apresentam critérios neuropatológicos da doença, apesar de estarem livres de sintomas cognitivos aparentes (Alzheimer's Association 2009; JACK et al. 2011). Avanços recentes em neuroimagem e ensaios com líquido (líquido cefalorraquidiano – LCR) já possibilitam a detecção *in vivo* de marcadores neuropatológicos da DA, como A β e tau (JACK et al. 2010). No entanto, terapias dirigidas a esses marcadores clássicos da DA mostraram efeito limitado depois que o processo neurodegenerativo já tinha se instalado. Estudos pré-clínicos em modelos animais de DA e ensaios clínicos envolvendo estágios de demência leve a moderada têm falhado em demonstrar benefícios clínicos, mesmo evidenciando a diminuição na carga de A β (BARD et al. 2000; DEMATTOS et al. 2001; FLEISHER et al. 2008; HOLMES et al. 2008; SALLOWAY et al. 2009). Embora essa área de estudo já esteja migrando para ensaios clínicos de estágios mais iniciais da doença, como o comprometimento cognitivo leve (CCL), a DA seria melhor tratada antes de um comprometimento cognitivo significativo, em estágios “pré-sintomáticos” ou “pré-clínicos”. Nesse sentido, o presente estudo, de maneira pioneira, avaliou marcadores de ciclo celular em indivíduos com DA pré-clínica, já que evidências crescentes têm implicado a reativação anormal do ciclo celular como uma importante característica neuropatológica da DA.

Proteínas que normalmente funcionam para controlar a progressão do ciclo celular em células que ativamente se dividem podem desempenhar papel na morte de neurônios pós-mitóticos diferenciados (PARK et al. 1997a e b; PARK et al. 1998a e b; PARK et al. 2000). A perda de regulação de CDKs e seus parceiros, como ciclinas e inibidores de CDKs, indicando uma ativação do ciclo celular em neurônios pós-mitóticos, tem sido observada na DA (LOPES et al. 2009).

5.1 QUINASES DEPENDENTES DE CICLINA (CDKS)

As CDKs são quinases de serina-treonina que são ativadas pela associação com um parceiro regulatório (isto é, ciclina ou outra proteína) (DHAVAN e TSAI 2001). A progressão ordenada das fases do ciclo de divisão celular (G1, S, G2 e M) é dirigida pela ativação sequencial de CDKs, que é controlada através de reguladores positivos e negativos. O segmento inicial do ciclo celular, a fase G1, é o sítio de integração de sinais mitóticos que resultam da ativação tanto de receptores de fatores de crescimento, quanto de integrinas (ASSOIAN e SCHWARTZ 2001), convergindo na ativação de CDKs da fase G1, Cdk4 e Cdk2 (SHERR 1994). A atividade das CDKs determina se os sinais mitogênicos serão propagados, induzindo a fosforilação de substratos chaves necessários para a progressão de G1 e entrada na fase S. A principal função das quinases da fase G1 é fosforilar a proteína retinoblastoma.

A atividade dessas quinases é controlada em múltiplos níveis: (i) acúmulo de ciclinas, (ii) montagem de um complexo CDK-ciclina, (iii) fosforilação, e (iv) associação com proteínas inibitórias (PAVLETICH 1999).

A primeira onda da atividade de quinases dependentes de ciclina D é seguida, no final da fase G1, pelo aumento na atividade de Cdk2-ciclina E (KOFF et al. 1992), que é responsável pela transição G1/S. Cdk2 reforça a fosforilação de Rb e induz a degradação de p27^{kip1}. O ciclo celular fica, então, irreversivelmente comprometido a entrar na fase S. Conforme as células transitam pela fase S, a proteólise de ciclina E ocorre (WON e REED 1996). Durante a fase S, Cdk2-ciclina A fosforila vários substratos, permitindo a replicação do DNA. Na transição S/G2, Cdk1 associa-se com a ciclina A. No final de G2, Cdk1-ciclina B aparece e desencadeia a transição G2/M, enquanto ciclina A é degradada (PETERS 1998), o que reseta o sistema e reestabelece o requerimento de sinais mitogênicos para induzir ciclinas do tipo D para o próximo ciclo. As sucessivas ondas de ativação e inativação de CDKs são reguladas por modificações pós-traducionais e translocações subcelulares de reguladores positivos e negativos, e são coordenadas de maneira dependente da conclusão de passos anteriores, através do controle dos pontos de checagem (LEW 2000). Estes pontos de checagem permitem decisões alternativas entre progressão, parada do ciclo, ou indução de apoptose. Uma resposta apoptótica poderia, então, ser inerente a uma ativação inapropriada do ciclo celular em células altamente diferenciadas (COPANI et al. 2001; LIU e GREENE 2001).

Várias CDKs críticas para a progressão do ciclo celular, como Cdk1 (Cdc2), Cdk4 e Cdk5, estão com expressão alterada na DA (LEDESMA et al. 1992; VINCENT et al. 1997; BUSSER et al. 1998; PATRICK et al. 1999). Nós encontramos níveis de expressão elevados de Cdk4 e Cdk1 no grupo de DA sintomática (DA-CP) comparados aos níveis dos grupos de DA assintomática (DA-P) e de normais. Dois trabalhos, que avaliaram o hipocampo de cérebros humanos

pós-mortem, também encontram uma maior expressão de Cdk4 nos indivíduos portadores de DA (sintomática) comparados a indivíduos normais, utilizando a técnica de imuno-histoquímica (MCSHEA et al. 1997; BUSSER et al. 1998). VINCENT et al. (1997), comparando 9 indivíduos com DA com 7 indivíduos normais, identificaram maiores níveis de expressão nuclear de Cdk1 no hipocampo do grupo com DA.

Em relação à Cdk5, quando localizada no núcleo, se liga à E2f1 reduzindo a capacidade deste fator de transcrição se ligar ao DNA. Tanto p27 quanto p35 (subunidade reguladora de Cdk5) são necessários para a formação do complexo E2f1-Cdk5 (Figura 32). Se Cdk5 perde a capacidade de se ligar ou à p27 ou à p35, essa função de supressão do ciclo celular é eliminada. Cdk5 é retida no núcleo por p27, e Cdk5 parece que bloqueia a translocação de p27 para o citoplasma. Se esta interação (Cdk5-p27) for perdida, Cdk5 é exportada para o citoplasma (ZHANG et al. 2010; ZHANG et al. 2012). Nossos resultados são interessantes, pois nos indivíduos com DA-CP encontramos níveis de Cdk5 reduzidos no núcleo e aumentados no citoplasma, níveis nucleares de p27 diminuídos, e E2f1 aumentada no núcleo, o que indica, fortemente, a perda da função de supressão do ciclo celular exercida pela Cdk5. Por outro lado, a expressão de Cdk5 no citoplasma esta relacionada à fosforilação da proteína Tau com consequente alteração do citoesqueleto e perda sináptica (KEENEY et al. 2012).

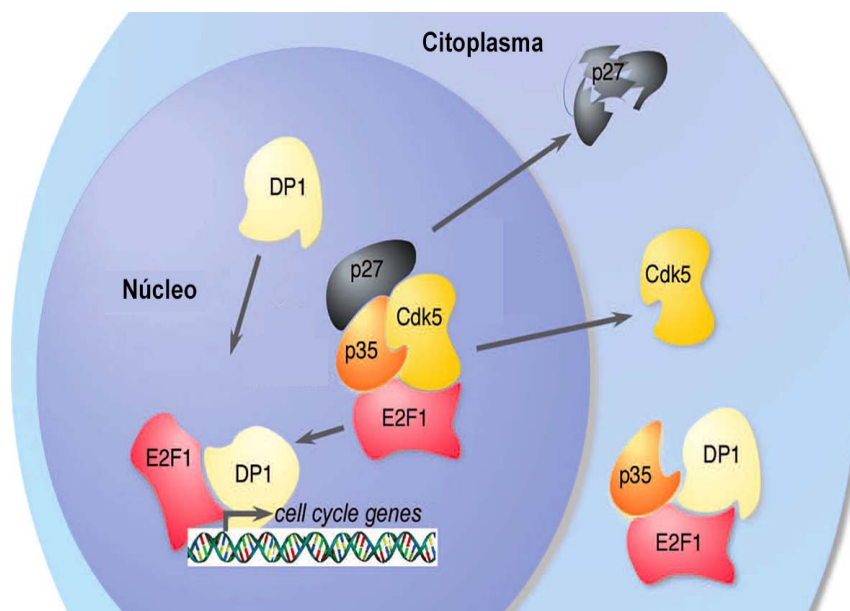


Figura 32 - Modelo ilustrando o bloqueio de ciclo celular neuronal pela Cdk5. Para que o ciclo celular normal prossiga, E2F1 deve se ligar ao seu cofator, DP1, para ativar uma variedade de genes relacionados ao ciclo celular. Quando Cdk5 está no núcleo, ela se liga a E2F1, reduzindo a capacidade de E2F1 se ligar ao DNA. Tanto p27 como p35 são necessários para a formação do complexo E2F1-Cdk5. No citoplasma, onde os níveis de p27 são baixos, Cdk5, não consegue fazer um complexo com E2F1 e p35. Cdk5 é retida no núcleo por p27. Se esta interação é perdida, Cdk5 é exportada para o citoplasma. Cdk5 nuclear também parece bloquear a translocação de p27 para o citoplasma. Se Cdk5 perder sua capacidade de se ligar a p27 ou a p35, a supressão do ciclo celular é eliminada.

5.2 CICLINAS

Quando células quiescentes entram na fase G1, genes codificantes de ciclinas do tipo D são induzidos em resposta a sinais mitogênicos. Durante a progressão de G1, o nível de ciclinas do tipo D aumenta, ativando seus parceiros catalíticos, Cdk4 e Cdk6 (MATSUSHIME et al. 1994). A principal função da ciclina D é realizar a ligação entre o estímulo mitogênico e ativação da maquinaria para a progressão do ciclo celular. O nível de ciclina D1 - um regulador crítico da transição de G0 para a

fase G1 que age através da ativação de Cdk4 – está aumentado em neurônios propensos à neurodegeneração na DA (BUSSER et al. 1998; ARENDT 2000). Outras ciclinas, como ciclinas E e A - envolvidas na regulação da transição G1/S, assim como ciclina B - reguladora da transição G2/M, também estão elevadas (NAGY et al. 1997; VINCENT et al. 1997; SMITH et al. 1999; ARENDT 2000). BUSSER et al. (1998), na análise do hipocampo de 12 indivíduos com DA e 8 sujeitos normais, identificaram uma maior expressão de ciclina D no grupo com DA. Consistente com esses dados, YANG et al. (2003) também identificaram níveis maiores de expressão de ciclina D no hipocampo de 9 indivíduos com DA quando comparados a 6 indivíduos normais. Tanto BUSSER et al. (1998), quanto VINCENT et al. (1997) observaram maiores níveis de expressão de ciclina B1 quando compararam o hipocampo de indivíduos com DA com sujeitos normais. Nesse estudo, foi detectado aumento na expressão das ciclinas D1 e B1 em indivíduos com DA sintomática em relação a indivíduos com DA assintomática e idosos normais.

5.3 INIBIDORES DE CDK

A atividade de CDKs é negativamente regulada por inibidores que se ligam diretamente a elas ou aos complexos CDK-ciclina (SHERR e ROBERTS 1995). De acordo com as características estruturais, esses inibidores são agrupados em duas famílias, INK4 e Cip/Kip. A família INK4 (inibidores de cdk4) consiste em quatro membros, p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} e p19^{INK4d}. Todas essas proteínas podem inibir quinases associadas à ciclina D, competindo com a ciclina D pela ligação com uma CDK (PARRY et al. 1999). Três proteínas compõem a família Cip/Kip (do inglês,

cdk interacting protein/kinase inhibitory protein): p21^{Cip1}, p27^{Kip1} e p57^{Kip2}. Comparadas à família INK4, elas apresentam uma especificidade inibitória mais abrangente, afetando a atividade de quinases dependentes de ciclina D, ciclina E e ciclina A (POLYAK et al. 1994).

Representantes de ambas as famílias, como p16^{INK4a}, p21^{Cip1} e p27^{Kip1} apresentam alterações na DA (ARENDRT et al. 1996; ARENDRT et al. 1998b). Um aumento de expressão de p27 no citoplasma do hipocampo de indivíduos com DA comparados a indivíduos normais foi identificado por OGAWA et al. (2003). A translocação do núcleo para o citoplasma inativa p27 (REYNISDÓTTIR e MASSAGUÉ 1997), e esse sequestro de p27 no citoplasma é essencial para que a sinalização de progressão do ciclo celular continue (PEREZ-ROGER et al. 1999). Nesse trabalho foi observado um nível menor de expressão de p27 no núcleo de indivíduos com DA-CP quando comparado com os níveis de indivíduos com DA-P e normais.

5.4 PROTEÍNA RETINOBLASTOMA

A atividade de CDKs determina se os sinais mitogênicos são propagados, resultando na fosforilação de substratos requeridos para a progressão de G1. Um desses substratos é a proteína retinoblastoma (Rb). A ativação de CDKs pela ciclina D inicia a fosforilação de Rb na metade da fase G1, quando cdk2-ciclina E torna-se ativo e completa este processo, fosfolirando Rb em sítios adicionais (LUNDBERG e WEINBERG 1998).

Em células quiescentes, Rb encontra-se hipofosforilada, e fatores de transcrição como E2F liga-se a esta forma de Rb, agindo como um inibidor da proliferação (TANNOCH et al. 2000). O complexo Rb-E2F associa-se a sítios de ligação de genes responsivos a E2F, reprimindo a transcrição (LUO et al. 1998). A fosforilação de Rb rompe sua associação com E2F, permitindo a transcrição de vários genes envolvidos no ciclo celular, incluindo enzimas de duplicação do DNA, proto-oncogenes, e proteínas reguladoras do ciclo, como as ciclinas E e A, ambas necessárias para a transição G1/S (BLACK e AZIZKHAN-CLIFFORD 1999).

Além do envolvimento na regulação do ciclo celular, E2F também exerce um papel na apoptose. GIOVANNI et al. (1999) mostraram que a morte neuronal induzida pela toxicidade de A β envolve a via de sinalização de E2F1, induzindo a expressão de mediadores pró-apoptóticos, como Bax (GIOVANNI et al. 2000) e Bim (BISWAS et al. 2007).

Como já foi mencionado acima, Rb se complexa com E2F1 impedindo que esta promova a transcrição de genes promotores da progressão do ciclo celular. Assim, o complexo Rb-E2F1 exerce um papel crucial no controle da progressão de ciclo (TANNOCH et al. 2000), principalmente em neurônios (LIU e GREENE 2001), uma vez que são células pós-mitóticas. Dessa forma, é compreensível que não identificamos diferença de expressão de Rb não fosforilada (hipofosforilada) entre os grupos do estudo, já que a maioria dos neurônios não se divide, ou seja, se encontram em G0. Entretanto, como encontramos alteradas as expressões tanto de Cdk4 quanto de ciclina D em indivíduos com DA-CP, a avaliação de Rb fosforilada, como esperado, mostrou a elevação na expressão desta no grupo DA-CP na comparação com os grupos DA-P e N. THAKUR et al. (2008) também identificaram níveis

aumentados de Rb fosforilada no hipocampo de 12 sujeitos com DA quando comparados a 9 controle tanto no núcleo quanto no citoplasma. Interessantemente, esses autores constataram que a expressão citoplasmática colocalizava-se com os emaranhados neurofibrilares nos sujeitos com DA.

Analisando o cérebro de 18 indivíduos com DA e 11 normais, JORDAN-SCIUTTO et al. (2002) observaram uma maior imunoreatividade de E2F1 no grupo com DA, apesar da marcação ser predominantemente citoplasmática, assim como nós constatamos um nível elevado de E2F1 nos sujeitos com DA sintomática comparados aos indivíduos com DA assintomática e normais.

5.5 REPLICAÇÃO DO DNA

Esse trabalho mostra a alteração da expressão ectópica de várias moléculas do ciclo celular, assim como vários outros trabalhos têm observado tais alterações na DA (MOSER et al. 1994; ARENDT et al. 1996; MCSHEA et al. 1997; NAGY et al. 1997; VINCENT et al. 1997; ARENDT et al. 1998a e b; NAGY et al. 1998; MCSHEA et al. 1999; SMITH et al. 1999; ARENDT 2000; ARENDT et al. 2000; HUSSEMAN et al. 2000; NAGY 2000; ZHU et al. 2000; DRANOVSKY et al. 2001; ARENDT 2002; JORDAN-SCIUTTO et al. 2002). A desregulação na expressão dessas ckds, ciclinas e inibidores de cdk indica uma ativação do ciclo celular em neurônios pós-mitóticos. Porém, uma questão importante é levantada por esses achados: o aparecimento imunohistoquímico de proteínas do ciclo celular tem algum significado funcional em termos de progressão real do ciclo celular ou seria o reflexo de uma desregulação mais global e não específica de síntese proteica? Apesar de nós

não termos conseguido realizar um experimento para verificar a duplicação do material genético, outros grupos conseguiram demonstrar que, na DA, uma fração significativa de neurônios hipocámpais e de outras regiões encefálicas tem seu DNA replicado completamente ou parcialmente (de $2n$ a $4n$) (YANG et al. 2001; YANG et al. 2006; MOSCH et al. 2007). Isto é uma indicação direta de que a replicação de DNA ocorreu em células neuronais. Esses achados também reafirmam que a expressão ectópica de proteínas do ciclo celular coordena a progressão do ciclo celular. Entretanto, esses neurônios nunca alcançam a fase M e acabam se degenerando por apoptose (HERNÁNDEZ-ORTEGA et al. 2007).

5.6 NEUROLOGIA DA DOENÇA DE ALZHEIMER E RE-ENTRADA NO CICLO CELULAR

Características neuropatológicas da DA, como o acúmulo de A β e tau, podem estar relacionados à re-entrada no ciclo celular (HERNÁNDEZ-ORTEGA et al. 2007; MAJD et al. 2008). No entanto, não é claro se a re-expressão de proteínas do ciclo celular ocorre como resultado destes eventos patológicos ou se, opostamente, a re-entrada no ciclo celular é um desencadeador do desenvolvimento das alterações histopatológicas típicas da DA. De fato, a re-expressão de proteínas do ciclo celular em neurônios pode ser induzida pelo tratamento com o peptídeo A β sozinho (MAJD et al. 2008) ou em combinação com a proteína tau (HOERNDLI et al. 2007). Estudos de células tratadas com A β demonstram que a fosforilação de Rb precede a ativação de Bax, um membro pró-apoptótico da família Bcl-2, que leva à ativação de caspase-3 e morte neuronal (GIOVANNI et al. 2000; RAMALHO et al. 2004). Ademais, a

presença da mutação sueca no gene *APP* - uma dupla mutação que precede a porção N-terminal do domínio de A β e causa um aumento de até seis vezes na geração de A β devido à intensificação da clivagem proteolítica nos sítios da β -secretase (SUH e CHECLER 2002), leva a níveis aumentados de proteínas do ciclo celular *in vitro* e *in vivo* (AHN et al. 2008). Em contrapartida, estudos suportam a ideia de que a reativação do ciclo celular dirigida por proto-oncogenes pode induzir alterações neuropatológicas típicas da DA em neurônios diferenciados (MCSHEA et al. 2007; PARK et al. 2007). MCSHEA et al. (2007) mostraram que, através da expressão dos oncogenes c-myc e ras, neurônios corticais pós-mitóticos de cultura primária passam a re-expressar ciclina B1 (com aumento do conteúdo de DNA) e sofrem fosforilação da proteína tau. Além disso, camundongos transgênicos, com ativação forçada do ciclo em neurônios diferenciados via expressão condicional do antígeno T do SV40, formam depósitos de placas amiloides (PARK et al. 2007).

Outra possível ligação entre a patologia de A β e tau e a reativação do ciclo celular é a Cdk5. Diferente dos outros componentes da família de CDKs, pois não exerce uma ação regulatória direta sobre o ciclo celular em células proliferantes (DHAVAN e TSAI 2001), Cdk5 está ativo, principalmente, em neurônios pós-mitóticos, onde seu ativador, p35, é expresso (TSAI et al. 1994). Sob condições de neurotoxicidade (tratamento com peróxido de hidrogênio ou altas concentrações de glutamato), p35 é clivada por uma família de proteases chamadas calpains, levando à formação do ativador truncado p25 em cultura primária de neurônios corticais (LEE et al. 2000). O complexo p25/Cdk5 apresenta uma atividade maior do que quando p35 está associada com esta quinase, além de hiperfosforilar substratos que normalmente não são fosforilados por esta quinase (PATRICK et al. 1999). Por

exemplo, o acúmulo de p25 na DA está associado à hiperfosforilação de tau, que leva à formação de ENFs, rompimento do citoesqueleto e morte neuronal apoptótica (TSAI et al. 2004). Interessantemente, a superativação de Cdk5 tem sido descrita em outras condições neurodegenerativas, nas quais eventos ectópicos do ciclo celular também foram relatados (NGUYEN et al. 2003; HÖGLINGER et al. 2007; LOPES et al. 2007).

Além disso, a perda de regulação de Cdk5 devido ao aumento nos níveis de estresse oxidativo pode causar neurodegeneração via alterações na expressão de Cdk4 (NGUYEN et al. 2003). LOPES et al. (2010) demonstraram que Cdk5 pode, de fato, agir como um mediador da reativação do ciclo celular neuronal induzido por peptídeos A β . Neurônios corticais em cultura incubados com A β aumentaram os níveis de Cdk4, fosfo-Rb e PCNA, mas não de marcador de fase M, fosfo-histona H3, confirmando que, embora neurônios tratados com A β alcancem a fase S ou G2, eles não passam o ponto de checagem G2/M. Entretanto, quando a atividade de Cdk5 foi bloqueada, alterações nos níveis de marcadores do ciclo celular não foram detectadas.

Nosso trabalho contribui para o modelo proposto por LOPES e AGOSTINHO (2011), em que ressaltam o papel de Cdk5 na re-entrada do ciclo celular. Resumidamente, eles propõem que quando Cdk5 se localiza no núcleo, o complexo Cdk5/p35 estabiliza p27, uma proteína supressora do ciclo celular. Além disso, Cdk5/p35, por se associar com E2F-1, bloqueia a ligação deste fator de transcrição com seu ativador DP1, interrompendo, assim, o ciclo celular em neurônios pós-mitóticos. Entretanto, a clivagem de p35 em p25 – que ocorre na DA – causa a ruptura deste complexo. Cdk5 é então translocada para o citoplasma e, no

núcleo, a associação de E2F1 com DP1, assim como o aumento de expressão de diferentes proteínas, como Cdks 2, 4 e 6, irão induzir a progressão de G1 para a fase S. Porém, esses neurônios, ativos no ciclo celular, não ultrapassam o ponto de checagem G2/M, provavelmente saindo do ciclo celular em algum instante das fases S ou G2 e avançando para a via apoptótica.

Essa influência da neuropatologia da DA na re-entrada do ciclo celular e a consequente morte neuronal aplica-se aos indivíduos com DA sintomática. No entanto, sujeitos com DA pré-clínica, que também possuem alto nível de lesões histopatológicas características da DA, não reativam o ciclo celular e apresentam menos morte celular, como mostrado nesse trabalho. Isso indica, fortemente, que existem mecanismos compensatórios (reserva cognitiva) que ajudam na manutenção do status cognitivo desses indivíduos assintomáticos, e um desses mecanismos é o controle do ciclo celular.

YANG et al. (2003) relataram que a expressão de proteínas do ciclo celular está elevada em um estágio inicial da neurodegeneração, chamado de comprometimento cognitivo leve (CCL), que refere-se a pessoas cuja memória ou outras capacidades cognitivas não estão normais, mas não têm demência diagnosticada clinicamente. Sabe-se que cerca de 25% - 35% de indivíduos diagnosticados com CCL progridem para DA dentro de 3 – 5 anos (BENNETT et al. 2002; BOYLE et al. 2006). YANG et al. (2003) mostraram que, em cérebros de indivíduos que morreram com CCL, a porcentagem de neurônios hipocâmpais positivos para proteínas do ciclo celular (PCNA, ciclina D e ciclina B) é muito próxima àquela encontrada em indivíduos que morreram em estágios avançados da DA. Estes achados sugerem que a morte neuronal associada à re-entrada no ciclo

celular é fator determinante para a manifestação do declínio cognitivo. Assim como nós encontramos com o experimento de morte celular, outros estudos reforçam o papel da morte neuronal na expressão clínica da demência. WEST et al. (2004) e PRICE et al. (2001) também encontraram uma perda significativa de neurônios no hipocampo de indivíduos com DA. Entretanto, observaram pouca ou nenhuma perda nos indivíduos com DA pré-clínica e sujeitos normais.

Portanto, é essencial o controle adequado da maquinaria do ciclo celular em neurônios pós-mitóticos para que não haja uma reativação do ciclo e a consequente morte neuronal. Contudo, algumas vias de sinalização do ciclo celular são utilizadas por neurônios diferenciados para regular processos biológicos que podem ser importantes para a reserva cognitiva, como plasticidade sináptica e metabolismo energético.

A perda sináptica é o principal substrato neurobiológico de disfunção cognitiva na DA (DEKOSKY e SCHEFF 1990; DEKOSKY et al. 1992; LASSMANN et al. 1992; MASLIAH et al. 1995; ARENDT 2009). A falha sináptica é um evento inicial na patogênese, podendo já ser detectável em pacientes com CCL (MASLIAH et al. 2001; SCHEFF et al. 2006). Embora, com a progressão da doença, haja um declínio na população sináptica (ARENDT 2009), estudos sugerem um processo bifásico com um aumento inicial de marcadores sinápticos nos estágios iniciais da doença (MUKAETOVA-LADINSKA et al. 2000; COUNTS et al. 2006; BELL et al. 2007; LEUBA et al. 2008), sugerindo uma reorganização sináptica como mecanismo de compensação antes de alcançar um estágio de função sináptica comprometida. A via p21^{ras}-MAP quinase, uma via mitogênica que em células

capazes de se dividir controla proliferação, no sistema nervoso adulto regula a plasticidade de neurônios diferenciados (ARENDRT et al. 2004).

O metabolismo energético é outro processo biológico, importante para a sobrevivência neuronal, que pode ser regulado por vias de sinalização do ciclo celular. Apesar dos estudos indicarem uma redução no metabolismo de glicose na DA, recentemente, tem sido demonstrado que em regiões cerebrais com acúmulo de A β , parece haver uma troca no perfil metabólico, com a mudança da respiração mitocondrial (fosforilação oxidativa) para um perfil glicolítico, como um mecanismo compensatório para a produção de energia (VLASSENKO et al. 2010). Embora a conversão de glicose para piruvato pela via glicolítica gere menos energia que a fosforilação oxidativa, a glicólise é a via mais rápida para manter os níveis de ATP quando se está sob alta demanda energética (PFEIFFER et al. 2001). Além de gerar energia mais rápido, a síntese de metabólitos intermediários, a partir da via glicolítica, fornece precursores para a geração de lipídeos, aminoácidos e nucleotídeos que são necessários para o crescimento celular (DEBERARDINIS et al. 2008). A ativação de oncogenes e/ou a inativação de supressores tumorais podem indiretamente modular os componentes de vias metabólicas. A regulação da captação e o destino da glicose podem ser alterados pela ativação de genes codificadores de Ras, Akt ou Myc (HSU e SABATINI 2008) e pela perda de função de proteínas supressoras tumorais como, PTEN (do inglês, *phosphatase and tensin homolog*) e p53 (JONES e THOMPSON 2009).

Assim, após terem saído do ciclo celular, neurônios diferenciados são capazes de usar mecanismos moleculares, primariamente desenvolvidos na regulação da proliferação, para controlar mecanismos compensatórios, como a plasticidade

sináptica e o metabolismo energético. Isso coloca neurônios em risco, pois sinais derivados desses processos biológicos podem ser erroneamente convertidos na ativação do ciclo celular, levando-os à morte celular. Portanto, quando neurônios não são capazes de apropriadamente controlar mecanismos do ciclo celular, o que serviria para regular mecanismos compensatórios, eles reativam o ciclo celular e, conseqüentemente, morrem, culminando na manifestação clínica da doença (DA sintomática). No entanto, quando os neurônios utilizam, efetivamente, vias do ciclo celular para desempenhar funções compensatórias, indivíduos, mesmo com lesões histopatológicas substanciais, conseguem manter sua função cognitiva normal (DA assintomática). A manutenção de um fenótipo diferenciado, mas altamente plástico é essencial para se evitar a neurodegeneração (ARENDRT 2003).

Esse trabalho possui uma relevância muito importante, pois consegue diferenciar, através de marcadores de ciclo e morte celular, indivíduos com a mesma carga de lesões neuropatológicas, mas que diferem na emergência clínica do quadro demencial. Entretanto, nós observamos uma ampla variação nas porcentagens de neurônios imunopositivos de indivíduo para indivíduo. Essa limitação foi contornada pela utilização de um método de análise de expressão que levou em consideração não só porcentagem, mas também a intensidade das células marcadas. Apesar de termos encontrado significância estatística para as diferenças encontradas, o aumento do tamanho amostral ajudaria a aumentar a robustez dos nossos dados.

Estudos adicionais são necessários para o melhor entendimento dos mecanismos patogênicos, principalmente, dos estágios iniciais da DA, e para descorta e validação de biomarcadores pré-clínicos e alvos terapêuticos. Para isso, estudos com modelos animais pré-clínicos serão de extrema importância no

desenvolvimento de intervenções terapêuticas que sejam capazes de retardar a progressão das alterações patológicas ou, até mesmo, postergar o aparecimento dos sintomas clínicos da demência (BROOKMEYER et al. 1998; DEKOSKY e MAREK 2003).

6 CONCLUSÕES

Os indivíduos com DA clínico-patológica (sintomática) apresentam níveis alterados de expressão em relação aos marcadores de ciclo celular e de morte celular, indicando que a re-entrada no ciclo celular e a consequente morte neuronal contribuem para a manifestação clínica da demência.

Já os sujeitos portadores da neuropatologia característica da DA, mas sem evidência de declínio cognitivo (DA-P) assemelham-se aos indivíduos normais em relação aos marcadores de ciclo celular e de morte celular, indicando que a não reativação do ciclo celular e morte celular reduzida contribuem para a manutenção do status cognitivo normal.

Esses resultados sugerem, fortemente, que o controle do ciclo celular em neurônios pós-mitóticos representa um mecanismo molecular de reserva cognitiva, uma vez que DA-CP e DA-P apresentam os mesmos níveis lesão patológica, porém diferem na manifestação clínica da doença.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahn KW, Joo Y, Choi Y, et al. Swedish amyloid precursor protein mutation increases cell cycle-related proteins in vitro and in vivo. **J Neurosci Res** 2008; 86:2476-87.

Ahuja D, Sáenz-Robles MT, Pipas JM. SV40 large T antigen targets multiple cellular pathways to elicit cellular transformation. **Oncogene** 2005; 24:7729-45.

Aimone JB, Wiles J, Gage FH. Potential role for adult neurogenesis in the encoding of time in new memories. **Nat Neurosci** 2006; 9:723-7.

Alzheimer Disease Mutation Database. **Alzheimer disease & fronto temporal dementia mutation database**. Available from: <URL:<http://www.molgen.ua.ac.be/ADMutations/default.cfm?MT=0&ML=0&Page=Home>> [2012 jan 20].

Alzheimer's Association. 2009 Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimers Dement** 2009; 5:234-70.

[Anonymous]. Consensus recommendations for the postmortem diagnosis of Alzheimer's disease. The National Institute on Aging, and Reagan Institute Working Group on Diagnostic Criteria for the Neuropathological Assessment of Alzheimer's Disease. **Neurobiol Aging** 1997; 18(Suppl):S1-2.

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, Holzer M, Gärtner U, Brückner MK. Aberrancies in signal transduction and cell cycle related events in Alzheimer's disease. **J Neural Transm Suppl** 1998a; 54:147-58.

Arendt T, Holzer M, Gärtner U. Neuronal expression of cycline dependent kinase inhibitors of the INK4 family in Alzheimer's disease. **J Neural Transm** 1998b; 105:949-60.

Arendt T. Alzheimer's disease as a loss of differentiation control in a subset of neurons that retain immature features in the adult brain. **Neurobiol Aging** 2000; 21:783-96.

Arendt T, Holzer M, Stöbe A, et al. Activated mitogenic signaling induces a process of dedifferentiation in Alzheimer's disease that eventually results in cell death. **Ann N Y Acad Sci** 2000; 920:249-55.

Arendt T. Dysregulation of neuronal differentiation and cell cycle control in Alzheimer's disease. **J Neural Transm Suppl** 2002; (62):77-85.

Arendt T. Synaptic plasticity and cell cycle activation in neurons are alternative effector pathways: the 'Dr. Jekyll and Mr. Hyde concept' of Alzheimer's disease or the yin and yang of neuroplasticity. **Prog Neurobiol** 2003; 71:83-248.

Arendt T, Gärtner U, Seeger G, et al. Neuronal activation of Ras regulates synaptic connectivity. **Eur J Neurosci** 2004; 19:2953-66.

Arendt T. Synaptic degeneration in Alzheimer's disease. **Acta Neuropathol** 2009; 118:167-79.

Assoian RK, Schwartz MA. Coordinate signaling by integrins and receptor tyrosine kinases in the regulation of G1 phase cell-cycle progression. **Curr Opin Genet Dev** 2001; 11:48-53.

Atwood CS, Martins RN, Smith MA, Perry G. Senile plaque composition and posttranslational modification of amyloid-beta peptide and associated proteins. **Peptides** 2002; 23:1343-50.

Avila J, Lucas JJ, Perez M, Hernandez F. Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. **Physiol Rev** 2004; 84:361-84.

Bard F, Cannon C, Barbour R, et al. Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. **Nat Med** 2000; 6:916-9.

Bell KF, Bennett DA, Cuello AC. Paradoxical upregulation of glutamatergic presynaptic boutons during mild cognitive impairment. **J Neurosci** 2007; 27:10810-7.

Bennett DA, Wilson RS, Schneider JA, et al. Natural history of mild cognitive impairment in older persons. **Neurology** 2002; 59:198-205.

Bennett DA, Schneider JA, Wilson RS, Bienias JL, Arnold SE. Education modifies the association of amyloid but not tangles with cognitive function. **Neurology** 2005; 65:953-5.

Besson A, Dowdy SF, Roberts JM. CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. **Dev Cell** 2008; 14:159-69.

Biswas SC, Liu DX, Greene LA. Bim is a direct target of a neuronal E2F-dependent apoptotic pathway. **J Neurosci** 2005; 25:8349-58.

Biswas SC, Shi Y, Vonsattel JP, Leung CL, Troy CM, Greene LA. Bim is elevated in Alzheimer's disease neurons and is required for beta-amyloid-induced neuronal apoptosis. **J Neurosci** 2007; 27:893-900.

Black AR, Azizkhan-Clifford J. Regulation of E2F: a family of transcription factors involved in proliferation control. **Gene** 1999; 237:281-302.

Bonnert TP, Bilsland JG, Guest PC, et al. Molecular characterization of adult mouse subventricular zone progenitor cells during the onset of differentiation. **Eur J Neurosci** 2006; 24:661-75.

Boyle PA, Wilson RS, Aggarwal NT, Tang Y, Bennett DA. Mild cognitive impairment: risk of Alzheimer disease and rate of cognitive decline. **Neurology** 2006; 67:441-5.

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

Brookmeyer R, Gray S, Kawas C. Projections of Alzheimer's disease in the United States and the public health impact of delaying disease onset. **Am J Public Health** 1998; 88:1337-42.

Buckner RL. Memory and executive function in aging and AD: multiple factors that cause decline and reserve factors that compensate. **Neuron** 2004; 44:195-208.

Burke WJ, Miller JP, Rubin EH, et al. Reliability of the Washington University Clinical Dementia Rating. **Arch Neurol** 1988; 45:31-2.

Busser J, Geldmacher DS, Herrup K. Ectopic cell cycle proteins predict the sites of neuronal cell death in Alzheimer's disease brain. **J Neurosci** 1998; 18:2801-7.

Buxbaum JD, Liu KN, Luo Y, et al. Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. **J Biol Chem** 1998; 273:27765-7.

Chen Y, McPhie DL, Hirschberg J, Neve RL. The amyloid precursor protein-binding protein APP-BP1 drives the cell cycle through the S-M checkpoint and causes apoptosis in neurons. **J Biol Chem** 2000; 275:8929-35.

Copani A, Uberti D, Sortino MA, Bruno V, Nicoletti F, Memo M. Activation of cell-cycle-associated proteins in neuronal death: a mandatory or dispensable path? **Trends Neurosci** 2001; 24:25-31.

Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. **Science** 1993; 261:921-3.

Counts SE, Nadeem M, Lad SP, Wu J, Mufson EJ. Differential expression of synaptic proteins in the frontal and temporal cortex of elderly subjects with mild cognitive impairment. **J Neuropathol Exp Neurol** 2006; 65:592-601.

Cummings JL, Cole G. Alzheimer disease. **JAMA** 2002; 287:2335-8.

Davis DG, Schmitt FA, Wekstein DR, Markesbery WR Alzheimer neuropathologic alterations in aged cognitively normal subjects. **J Neuropathol Exp Neurol** 1999; 58:376-88.

DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. **Cell Metab** 2008; 7:11-20.

DeKosky ST, Scheff SW. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. **Ann Neurol** 1990; 27:457-64.

DeKosky ST, Harbaugh RE, Schmitt FA, et al. Cortical biopsy in Alzheimer's disease: diagnostic accuracy and neurochemical, neuropathological, and cognitive correlations. Intraventricular Bethanecol Study Group. **Ann Neurol** 1992; 32:625-32.

DeKosky ST, Marek K. Looking backward to move forward: early detection of neurodegenerative disorders. **Science** 2003; 302:830-4.

DeMattos RB, Bales KR, Cummins DJ, Dodart JC, Paul SM, Holtzman DM. Peripheral anti-A beta antibody alters CNS and plasma A beta clearance and decreases brain A beta burden in a mouse model of Alzheimer's disease. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2001; 98:8850-5.

Dhavan R, Tsai LH A decade of CDK5. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2001; 2:749-59.

Dranovsky A, Vincent I, Gregori L, et al. Cdc2 phosphorylation of nucleolin demarcates mitotic stages and Alzheimer's disease pathology. **Neurobiol Aging** 2001; 22:517-28.

Dries DR, Yu G. Assembly, maturation, and trafficking of the gamma-secretase complex in Alzheimer's disease. **Curr Alzheimer Res** 2008; 5:132-46.

Elias MF, Beiser A, Wolf PA, Au R, White RF, D'Agostino RB. The preclinical phase of Alzheimer disease: A 22-year prospective study of the Framingham Cohort. **Arch Neurol** 2000; 57:808-13.

Ezhevsky SA, Ho A, Becker-Hapak M, Davis PK, Dowdy SF. Differential regulation of retinoblastoma tumor suppressor protein by G(1) cyclin-dependent kinase complexes in vivo. **Mol Cell Biol** 2001; 21:4773-84.

Feddersen RM, Ehlenfeldt R, Yunis WS, Clark HB, Orr HT. Disrupted cerebellar cortical development and progressive degeneration of Purkinje cells in SV40 T antigen transgenic mice. **Neuron** 1992; 9:955-66.

Fleisher AS, Raman R, Siemers ER, et al. Phase 2 safety trial targeting amyloid beta production with a gamma-secretase inhibitor in Alzheimer disease. **Arch Neurol** 2008; 65:1031-8.

Fukumoto H, Asami-Odaka A, Suzuki N, Shimada H, Ihara Y, Iwatsubo T. Amyloid beta protein deposition in normal aging has the same characteristics as that in Alzheimer's disease. Predominance of A beta 42(43) and association of A beta 40 with cored plaques. **Am J Pathol** 1996; 148:259-65.

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

Giovanni A, Wirtz-Brugger F, Keramaris E, Slack R, Park DS. Involvement of cell cycle elements, cyclin-dependent kinases, pRb, and E2F x DP, in B-amyloid-induced neuronal death. **J Biol Chem** 1999; 274:19011-6.

Giovanni A, Keramaris E, Morris EJ, et al. E2F1 mediates death of B-amyloid-treated cortical neurons in a manner independent of p53 and dependent on Bax and caspase 3. **J Biol Chem** 2000; 275:11553-60.

Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. **Biochem Biophys Res Commun** 1984; 120:885-90.

Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. **Nature** 1991; 349:704-6.

Godbolt AK, Cipolotti L, Anderson VM, et al. A decade of pre-diagnostic assessment in a case of familial Alzheimer's disease: tracking progression from asymptomatic to MCI and dementia. **Neurocase** 2005; 11:56-64.

Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. **Neuron** 1989; 3:519-26.

Green RC, Cupples LA, Go R, et al. Risk of dementia among white and African American relatives of patients with Alzheimer disease. **JAMA** 2002; 287:329-36.

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.

Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlan M, Tung YC, Zaidi MS, Wisniewski HM. Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. **J Biol Chem** 1986a; 261:6084-9.

Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1986b; 83:4913-7.

Han Z, Yang L, MacLellan WR, Weiss JN, Qu Z. Hysteresis and cell cycle transitions: how crucial is it? **Biophys J** 2005; 88:1626-34.

Hernández-Ortega K, Ferrera P, Arias C. Sequential expression of cell-cycle regulators and Alzheimer's disease-related proteins in entorhinal cortex after hippocampal excitotoxic damage. **J Neurosci Res** 2007; 85:1744-51.

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.

Ho A, Dowdy SF. Regulation of G(1) cell-cycle progression by oncogenes and tumor suppressor genes. **Curr Opin Genet Dev** 2002; 12:47-52.

Hoerndli FJ, Pelech S, Papassotiropoulos A, Götz J. Abeta treatment and P301L tau expression in an Alzheimer's disease tissue culture model act synergistically to promote aberrant cell cycle re-entry. **Eur J Neurosci** 2007; 26:60-72.

Höglinger GU, Breunig JJ, Depboylu C, et al. The pRb/E2F cell-cycle pathway mediates cell death in Parkinson's disease. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2007; 104:3585-90.

Holmes C, Boche D, Wilkinson D, et al. Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial. **Lancet** 2008; 372:216-23.

Hsu PP, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: warburg and beyond. **Cell** 2008; 134:703-7.

Hulette CM, Welsh-Bohmer KA, Murray MG, Saunders AM, Mash DC, McIntyre LM. Neuropathological and neuropsychological changes in "normal" aging: evidence for preclinical Alzheimer disease in cognitively normal individuals. **J Neuropathol Exp Neurol** 1998; 57:1168-74.

Husseman JW, Nochlin D, Vincent I. Mitotic activation: a convergent mechanism for a cohort of neurodegenerative diseases. **Neurobiol Aging** 2000; 21:815-28.

Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Alzheimer neurofibrillary degeneration: significance, etiopathogenesis, therapeutics and prevention. **J Cell Mol Med** 2008; 12:38-55.

Jack CR Jr, Knopman DS, Jagust WJ, et al. Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. **Lancet Neurol** 2010; 9:119-28.

Jack CR Jr, Albert MS, Knopman DS, et al. Introduction to revised criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: National Institute on Aging and the Alzheimer's Association workgroup. **Alzheimers Dement** 2011; 7:257-62.

Jacobs DM, Sano M, Dooneief G, Marder K, Bell KL, Stern Y. Neuropsychological detection and characterization of preclinical Alzheimer's disease. **Neurology** 1995; 45:957-62.

Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT Jr. The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Biochemistry** 1993; 32:4693-7.

Jones RG, Thompson CB. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. **Genes Dev** 2009; 23:537-48.

Jordan-Sciutto KL, Malaiyandi LM, Bowser R. Altered distribution of cell cycle transcriptional regulators during Alzheimer disease. **J Neuropathol Exp Neurol** 2002; 61:358-67.

Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, et al. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. **Nature** 1987; 325:733-6.

Katchanov J, Harms C, Gertz K, et al. Mild cerebral ischemia induces loss of cyclin-dependent kinase inhibitors and activation of cell cycle machinery before delayed neuronal cell death. **J Neurosci** 2001; 21:5045-53.

Katzman R, Aronson M, Fuld P, et al. Development of dementing illnesses in an 80-year-old volunteer cohort. **Ann Neurol** 1989; 25:317-24.

Katzman R. Education and the prevalence of dementia and Alzheimer's disease. **Neurology** 1993; 43:13-20.

Keeney JT, Swomley AM, Harris JL, et al. Cell cycle proteins in brain in mild cognitive impairment: insights into progression to Alzheimer disease. **Neurotox Res** 2012; 22:220-30.

Khachaturian ZS. Diagnosis of Alzheimer's disease. **Arch Neurol** 1985; 42:1097-105.

Knopman DS, Parisi JE, Salviati A, et al. Neuropathology of cognitively normal elderly. **J Neuropathol Exp Neurol** 2003; 62:1087-95.

Koff A, Giordano A, Desai D, et al. Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. **Science** 1992; 257:1689-94.

Kohn KW. Molecular interaction map of the mammalian cell cycle control and DNA repair systems. **Mol Biol Cell** 1999; 10: 2703-34.

Kruman II, Wersto RP, Cardozo-Pelaez F, et al. Cell cycle activation linked to neuronal cell death initiated by DNA damage. **Neuron** 2004; 41:549-61.

Kuan CY, Schloemer AJ, Lu A, et al. Hypoxia-ischemia induces DNA synthesis without cell proliferation in dying neurons in adult rodent brain. **J Neurosci** 2004; 24:10763-72.

Kurz A, Altland K, Lautenschlager N, et al. Apolipoprotein E type 4 allele and Alzheimer's disease: effect on age at onset and relative risk in different age groups. **J Neurol** 1996; 243:452-6.

Lassmann H, Weiler R, Fischer P, et al. Synaptic pathology in Alzheimer's disease: immunological data for markers of synaptic and large dense-core vesicles. **Neuroscience** 1992; 46:1-8.

Ledesma MD, Correias I, Avila J, Díaz-Nido J. Implication of brain cdc2 and MAP2 kinases in the phosphorylation of tau protein in Alzheimer's disease. **FEBS Lett** 1992; 308:218-24.

Lee MS, Kwon YT, Li M, Peng J, Friedlander RM, Tsai LH. Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. **Nature** 2000; 405:360-4.

Leuba G, Savioz A, Vernay A, et al. Differential changes in synaptic proteins in the Alzheimer frontal cortex with marked increase in PSD-95 postsynaptic protein. **J Alzheimers Dis** 2008; 15:139-51.

Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, et al. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. **Science** 1995; 269:973-7,

Lew DJ. Cell-cycle checkpoints that ensure coordination between nuclear and cytoplasmic events in *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr Opin Genet Dev** 2000; 10:47-53.

Li J, Meyer AN, Donoghue DJ. Nuclear localization of cyclin B1 mediates its biological activity and is regulated by phosphorylation. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1997; 94:502-7

Li R, Lindholm K, Yang LB, et al. Amyloid beta peptide load is correlated with increased beta-secretase activity in sporadic Alzheimer's disease patients. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2004; 101:3632-7.

Liu DX, Greene LA. Neuronal apoptosis at the G1/S cell cycle checkpoint. **Cell Tissue Res** 2001; 305:217-28.

Lopes JP, Oliveira CR, Agostinho P. Role of cyclin-dependent kinase 5 in the neurodegenerative process triggered by amyloid-Beta and prion peptides: implications for Alzheimer's disease and prion-related encephalopathies. **Cell Mol Neurobiol** 2007; 27:943-57.

Lopes JP, Oliveira CR, Agostinho P. Cell cycle re-entry in Alzheimer's disease: a major neuropathological characteristic? **Curr Alzheimer Res** 2009; 6:205-12.

Lopes JP, Oliveira CR, Agostinho P. Neurodegeneration in an Abeta-induced model of Alzheimer's disease: the role of Cdk5. **Aging Cell** 2010; 9:64-77.

Lopes JP, Agostinho P. Cdk5: multitasking between physiological and pathological conditions. **Prog Neurobiol** 2011; 94:49-63.

Lundberg AS, Weinberg RA. Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. **Mol Cell Biol** 1998; 18:753-61.

Luo RX, Postigo AA, Dean DC. Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription. **Cell** 1998; 92:463-73.

Majd S, Zarifkar A, Rastegar K, Takhshid MA. Different fibrillar Abeta 1-42 concentrations induce adult hippocampal neurons to reenter various phases of the cell cycle. **Brain Res** 2008; 1218:224-9.

Malik B, Currais A, Andres A, et al. Loss of neuronal cell cycle control as a mechanism of neurodegeneration in the presenilin-1 Alzheimer's disease brain. **Cell Cycle** 2008; 7:637-46.

Malumbres M, Barbacid M. Mammalian cyclin-dependent kinases. **Trends Biochem Sci** 2005; 30:630-41.

Masliah E, Mallory M, Ge N, Alford M, Veinbergs I, Roses AD. Neurodegeneration in the central nervous system of apoE-deficient mice. **Exp Neurol** 1995; 136:107-22.

Masliah E, Mallory M, Alford M, et al. Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease. **Neurology** 2001; 56:127-9.

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 U S A** 1985; 82:4245-9.

Matsushime H, Quelle DE, Shurtleff SA, Shibuya M, Sherr CJ, Kato JY. D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. **Mol Cell Biol** 1994; 14:2066-76.

McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. **Neurology** 1984; 34:939-44.

McLear JA, Garcia-Fresco G, Bhat MA, Van Dyke TA. In vivo inactivation of pRb, p107 and p130 in murine neuroprogenitor cells leads to major CNS developmental defects and high seizure rates. **Mol Cell Neurosci** 2006; 33:260-73.

McPhie DL, Coopersmith R, Hines-Peralta A, et al. DNA synthesis and neuronal apoptosis caused by familial Alzheimer disease mutants of the amyloid precursor protein are mediated by the p21 activated kinase PAK3. **J Neurosci** 2003; 23:6914-27.

McShea A, Harris PL, Webster KR, Wahl AF, Smith MA. Abnormal expression of the cell cycle regulators P16 and CDK4 in Alzheimer's disease. **Am J Pathol** 1997; 150:1933-9.

McShea A, Wahl AF, Smith MA. Re-entry into the cell cycle: a mechanism for neurodegeneration in Alzheimer disease. **Med Hypotheses** 1999; 52:525-7.

McShea A, Lee HG, Petersen RB, et al. Neuronal cell cycle re-entry mediates Alzheimer disease-type changes. **Biochim Biophys Acta** 2007; 1772:467-72.

Migliore L, Botto N, Scarpato R, Petrozzi L, Cipriani G, Bonuccelli U. Preferential occurrence of chromosome 21 malsegregation in peripheral blood lymphocytes of Alzheimer disease patients. **Cytogenet Cell Genet** 1999; 87:41-6.

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.

Mitchell TW, Mufson EJ, Schneider JA, et al. Parahippocampal tau pathology in healthy aging, mild cognitive impairment, and early Alzheimer's disease. **Ann Neurol** 2002; 51:182-9.

Mittnacht S. Control of pRB phosphorylation. **Curr Opin Genet Dev** 1998; 8:21-7.

Morris JC. The Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules. **Neurology** 1993; 43:2412-4.

Morris JC. Early-stage and preclinical Alzheimer disease. **Alzheimer Dis Assoc Disord** 2005; 19:163-5.

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.

Moser MB, Trommald M, Andersen P. An increase in dendritic spine density on hippocampal CA1 pyramidal cells following spatial learning in adult rats suggests the formation of new synapses. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1994; 91:12673-5.

Mukaetova-Ladinska EB, Garcia-Siera F, Hurt J, et al. Staging of cytoskeletal and beta-amyloid changes in human isocortex reveals biphasic synaptic protein response during progression of Alzheimer's disease. **Am J Pathol** 2000; 157:623-36.

Nagy Z, Esiri MM, Cato AM, Smith AD. Cell cycle markers in the hippocampus in Alzheimer's disease. **Acta Neuropathol** 1997; 94:6-15.

Nagy Z, Esiri MM, Smith AD. The cell division cycle and the pathophysiology of Alzheimer's disease. **Neuroscience** 1998; 87:731-9.

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

Nguyen MD, Mushynski WE, Julien JP. Cycling at the interface between neurodevelopment and neurodegeneration. **Cell Death Differ** 2002; 9:1294-306.

Nguyen MD, Boudreau M, Kriz J, Couillard-Després S, Kaplan DR, Julien JP. Cell cycle regulators in the neuronal death pathway of amyotrophic lateral sclerosis caused by mutant superoxide dismutase 1. **J Neurosci** 2003; 23:2131-40.

Noctor SC, Martínez-Cerdeño V, Ivic L, Kriegstein AR. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. **Nat Neurosci** 2004; 7:136-44.

Ogawa O, Lee HG, Zhu X, et al. Increased p27, an essential component of cell cycle control, in Alzheimer's disease. **Aging Cell** 2003; 2:105-10.

Park DS, Levine B, Ferrari G, Greene LA. Cyclin dependent kinase inhibitors and dominant negative cyclin dependent kinase 4 and 6 promote survival of NGF-deprived sympathetic neurons. **J Neurosci** 1997a; 17:8975-83.

Park DS, Morris EJ, Greene LA, Geller HM. G1/S cell cycle blockers and inhibitors of cyclin-dependent kinases suppress camptothecin-induced neuronal apoptosis. **J Neurosci** 1997b; 17:1256-70.

Park DS, Morris EJ, Padmanabhan J, Shelanski ML, Geller HM, Greene LA. Cyclin-dependent kinases participate in death of neurons evoked by DNA-damaging agents. **J Cell Biol** 1998a; 143:457-67.

Park DS, Morris EJ, Stefanis L, et al. Multiple pathways of neuronal death induced by DNA-damaging agents, NGF deprivation, and oxidative stress. **J Neurosci** 1998b; 18:830-40.

Park DS, Morris EJ, Bremner R, et al. Involvement of retinoblastoma family members and E2F/DP complexes in the death of neurons evoked by DNA damage. **J Neurosci** 2000; 20:3104-14.

Park KH, Hallows JL, Chakrabarty P, Davies P, Vincent I. Conditional neuronal simian virus 40 T antigen expression induces Alzheimer-like tau and amyloid pathology in mice. **J Neurosci** 2007; 27:2969-78.

Parry D, Mahony D, Wills K, Lees E. Cyclin D-CDK subunit arrangement is dependent on the availability of competing INK4 and p21 class inhibitors. **Mol Cell Biol** 1999; 19:1775-83.

Patrick GN, Zukerberg L, Nikolic M, de la Monte S, Dikkes P, Tsai LH. Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. **Nature** 1999; 402:615-22.

Pavletich NP. Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdk5, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. **J Mol Biol** 1999; 287:821-8.

Perez-Roger I, Kim SH, Griffiths B, Sewing A, Land H. Cyclins D1 and D2 mediate myc-induced proliferation via sequestration of p27(Kip1) and p21(Cip1). **EMBO J** 1999; 18:5310-20.

Peters JM. SCF and APC: the Yin and Yang of cell cycle regulated proteolysis. **Curr Opin Cell Biol** 1998; 10:759-68.

Pfeiffer T, Schuster S, Bonhoeffer S. Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways. **Science** 2001; 292:504-7.

Pines J. Mitosis: a matter of getting rid of the right protein at the right time. **Trends Cell Biol** 2006; 16:55-63.

Poirier J, Davignon J, Bouthillier D, Kogan S, Bertrand P, Gauthier S. Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. **Lancet** 1993; 342:697-9.

Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, et al. p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. **Genes Dev** 1994; 8:9-22.

Price JL, Morris JC. Tangles and plaques in nondemented aging and "preclinical" Alzheimer's disease. **Ann Neurol** 1999; 45:358-68.

Price JL, Ko AI, Wade MJ, Tsou SK, McKeel DW, Morris JC. Neuron number in the entorhinal cortex and CA1 in preclinical Alzheimer disease. **Arch Neurol** 2001; 58:1395-402.

Ramalho RM, Ribeiro PS, Solá S, Castro RE, Steer CJ, Rodrigues CM. Inhibition of the E2F-1/p53/Bax pathway by tauroursodeoxycholic acid in amyloid beta-peptide-induced apoptosis of PC12 cells. **J Neurochem** 2004; 90:567-75.

Reynisdóttir I, Massagué J. The subcellular locations of p15(Ink4b) and p27(Kip1) coordinate their inhibitory interactions with cdk4 and cdk2. **Genes Dev** 1997; 11:492-503.

Roe CM, Xiong C, Miller JP, Morris JC. Education and Alzheimer disease without dementia: support for the cognitive reserve hypothesis. **Neurology** 2007; 68:223-8.

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.

Salloway S, Sperling R, Gilman S, et al. A phase 2 multiple ascending dose trial of bapineuzumab in mild to moderate Alzheimer disease. **Neurology** 2009; 73:2061-70.

Scheff SW, Price DA, Schmitt FA, Mufson EJ. Hippocampal synaptic loss in early Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. **Neurobiol Aging** 2006; 27:1372-84.

Scheuner D, Eckman C, Jensen M, et al. Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. **Nat Med** 1996; 2:864-70.

Schmitt FA, Davis DG, Wekstein DR, Smith CD, Ashford JW, Markesbery WR. "Preclinical" AD revisited: neuropathology of cognitively normal older adults. **Neurology** 2000; 55:370-6.

Sherr CJ. G1 phase progression: cycling on cue. **Cell** 1994; 79:551-5.

Sherr CJ, Roberts JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. **Genes Dev** 1995; 9:1149-63.

Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, et al. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. **Nature** 1995; 375:754-60.

Silva AR, Grinberg LT, Farfel JM, et al. Transcriptional alterations related to neuropathology and clinical manifestation of Alzheimer's disease. **PLoS One** 2012; 7:e48751.

Simin K, Wu H, Lu L, et al. pRb inactivation in mammary cells reveals common mechanisms for tumor initiation and progression in divergent epithelia. **PLoS Biol** 2004; 2:E22.

Small BJ, Fratiglioni L, Viitanen M, Winblad B, Bäckman L. The course of cognitive impairment in preclinical Alzheimer disease: three- and 6-year follow-up of a population-based sample. **Arch Neurol** 2000; 57:839-44.

Smith MZ, Nagy Z, Esiri MM. Cell cycle-related protein expression in vascular dementia and Alzheimer's disease. **Neurosci Lett** 1999; 271:45-8.

Sohur US, Emsley JG, Mitchell BD, Macklis JD. Adult neurogenesis and cellular brain repair with neural progenitors, precursors and stem cells. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci** 2006; 361:1477-97.

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

Spremo-Potparevic B, Zivkovic L, Djelic N, Bajic V. Analysis of premature centromere division (PCD) of the X chromosome in Alzheimer patients through the cell cycle. **Exp Gerontol** 2004; 39:849-54.

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(Suppl 2):S69-74.

Stoothoff WH, Johnson GV. Tau phosphorylation: physiological and pathological consequences. **Biochim Biophys Acta** 2005; 1739:280-97.

Suh YH, Checler F. Amyloid precursor protein, presenilins, and alpha-synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. **Pharmacol Rev** 2002; 54:469-525.

Tannoch VJ, Hinds PW, Tsai LH. Cell cycle control. **Adv Exp Med Biol** 2000; 465:127-40.

Taupin P. Neurogenesis in the adult central nervous system. **C R Biol** 2006; 329:465-75.

Thakur A, Siedlak SL, James SL, et al. Retinoblastoma protein phosphorylation at multiple sites is associated with neurofibrillary pathology in Alzheimer disease. **Int J Clin Exp Pathol** 2008; 1:134-46.

Tsai LH, Takahashi T, Caviness VS Jr, Harlow E. Activity and expression pattern of cyclin-dependent kinase 5 in the embryonic mouse nervous system. **Development** 1993; 119:1029-40.

Tsai LH, Delalle I, Caviness VS Jr, Chae T, Harlow E. p35 is a neural-specific regulatory subunit of cyclin-dependent kinase 5. **Nature** 1994; 371:419-23.

Tsai LH, Lee MS, Cruz J. Cdk5, a therapeutic target for Alzheimer's disease? **Biochim Biophys Acta** 2004; 1697:137-42.

Tsujioka Y, Takahashi M, Tsuboi Y, Yamamoto T, Yamada T. Localization and expression of cdc2 and cdk4 in Alzheimer brain tissue. **Dement Geriatr Cogn Disord** 1999; 10:192-8.

Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, et al. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. **Science** 1999; 286:735-41.

Vilchez RA, Butel JS. Emergent human pathogen simian virus 40 and its role in cancer. **Clin Microbiol Rev** 2004; 17:495-508.

Vincent I, Jicha G, Rosado M, Dickson DW. Aberrant expression of mitotic cdc2/cyclin B1 kinase in degenerating neurons of Alzheimer's disease brain. **J Neurosci** 1997; 17:3588-98.

Vlassenko AG, Vaishnavi SN, Couture L, et al. Spatial correlation between brain aerobic glycolysis and amyloid- β (A β) deposition. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2010; 107:17763-7.

Wen Y, Yang S, Liu R, Simpkins JW. Cell-cycle regulators are involved in transient cerebral ischemia induced neuronal apoptosis in female rats. **FEBS Lett** 2005; 579:4591-9.

West MJ, Kawas CH, Stewart WF, Rudow GL, Troncoso JC. Hippocampal neurons in pre-clinical Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging** 2004; 25:1205-12.

Won KA, Reed SI. Activation of cyclin E/CDK2 is coupled to site-specific autophosphorylation and ubiquitin-dependent degradation of cyclin E. **EMBO J** 1996; 15:4182-93.

Wu Q, Combs C, Cannady SB, Geldmacher DS, Herrup K. Beta-amyloid activated microglia induce cell cycling and cell death in cultured cortical neurons. **Neurobiol Aging** 2000; 21:797-806.

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, 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.

Zhang J, Li H, Yabut O, Fitzpatrick H, D'Arcangelo G, Herrup K. Cdk5 suppresses the neuronal cell cycle by disrupting the E2F1-DP1 complex. **J Neurosci** 2010; 30:5219-28.

Zhang J, Herrup K. Nucleocytoplasmic Cdk5 is involved in neuronal cell cycle and death in post-mitotic neurons. **Cell Cycle** 2011; 10:1208-14.

Zhang J, Li H, Zhou T, Zhou J, Herrup K. Cdk5 levels oscillate during the neuronal cell cycle: Cdh1 ubiquitination triggers proteasome-dependent degradation during S-phase. **J Biol Chem** 2012; 287:25985-94.

Zhu X, Rottkamp CA, Boux H, Takeda A, Perry G, Smith MA. Activation of p38 kinase links tau phosphorylation, oxidative stress, and cell cycle-related events in Alzheimer disease. **J Neuropathol Exp Neurol** 2000; 59:880-8.

Zivkovic L, Spremo-Potparević B, Djelić N, Bajić V. Analysis of premature centromere division (PCD) of the chromosome 18 in peripheral blood lymphocytes in Alzheimer disease patients. **Mech Ageing Dev** 2006; 127:892-6.