

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**  
**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**“AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES PROCESSADORES DE DANOS  
OXIDATIVOS EM PACIENTES COM ALZHEIMER”**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, para a obtenção de título de Mestre em Ciências, área de concentração Genética.

**Pós-graduando: Douglas Vinicius Nogueira Perez de Oliveira**

**Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Elza Tiemi Sakamoto-Hojo**

Setembro / 2.007

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Ficha catalográfica

*OLIVEIRA, Douglas V. N. P. de*

“AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES PROCESSADORES DE DANOS OXIDATIVOS  
EM PACIENTES ALZHEIMER”

Ribeirão Preto, 2007

73 p. il. 30 cm

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de  
Ribeirão Preto, USP, departamento de Genética.

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Elza Tiemi Sakamoto-Hojo

## Apoio e suporte financeiro

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes entidades e instituições:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Proc nº 06/1947-8);
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq;
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES;
- Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência – FAEPA – FMRP/USP;
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP); e
- Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP/USP).

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora, **Profª Drª Elza Tiemi Sakamoto Hojo**, por ter me acolhido muito bem em seu laboratório e, principalmente, por me oferecer nesses anos de convívio mais do que orientação. Pelo carinho, amizade e respeito.

À **Profª Drª Catarina Satie Takahashi** pelo apoio constante e pela convivência prazerosa que me proporcionou. Exemplo de competência e dedicação à Biologia.

Ao **Prof. Dr. Geraldo Aleixo S. Passos Junior**, por permitir a utilização dos equipamentos de seu laboratório e pela confiança depositada em mim.

Ao **Prof. Dr. Julio C. Moriguti**, pela parceria e esclarecimentos neste trabalho, além de permitir a realização das coletas das pacientes em seu ambulatório.

Ao **Prof. Dr. Eduardo Ferrioli**, por permitir a coleta das amostras das pacientes no ambulatório de Geriatria do HC-FMRP/USP.

Ao **Prof. Dr. Charlys Nogueira Barbosa**, pela atenção, paciência e companheirinho dispensados a mim durante todo o trabalho. Muito obrigado pelo apoio e ensinamentos valiosos.

Aos **enfermeiros do ambulatório da Clínica Médica** do HC-FMRP/USP, por coletarem as amostras, em especial, **Maria Luiza e Edson**.

Aos **médicos da Clínica Médica** que permitiram a realização das coletas, especialmente, o Dr. Silvío, a Dr. Patrícia e Dr. Raquel, além dos médicos residentes.

Ao **Dr. João Manoel**, pela atenção e respeito com que me tratou durante o nosso período de convivência. Além da participação ativa do trabalho, fornecendo gentilmente algumas amostras de pacientes. Muito obrigado, Dr João.

Às **enfermeiras do ambulatório de geriatria do Sistema Único de Saúde** de Ribeirão Preto, unidade Campos Elíseos, pelo tempo e apoio dispensados, além da competência.

À **Profª Drª Nilce Maria Martinez Rossi**, chefe do departamento de Genética da FMRP/USP, e ao **Prof. Dr. Moacyr Antonio Mestriner**, ex-chefe do departamento, pela atenção e apoio.

Ao **Prof. Dr. Ademilson Espencer E. Soares**, coordenador do curso de pós-graduação do departamento de Genética da FMRP-USP e à **Profª Draª Lucia Regina Martelli**, ex-coordenador, pela preocupação e suporte.

Às funcionárias do departamento, **Susie Adriana Nalon, Maria Aparecida Elias e Cleusa Mazzucatto** (ex-secretária), pela prestatividade e atenção.

Aos pós-doutorandos **Stephano Spanó Mello e Cristina M. Junta** pelo apoio técnico e prestatividade.

À pós-doutoranda **Drª Ana Lucia Fachin**, a qual me apresentou a este laboratório.

Aos **professores membros da banca examinadora**, pela disponibilidade e contribuição com críticas e sugestões.

Aos **colegas do Laboratório de Imunogenética Molecular**, pelo carinho atenção e disponibilidade em todos os momentos que precisei.

Aos técnicos deste laboratório, **Sueli Aparecida Neves** e **Luiz Augusto da Costa Junior**, por toda a assistência prestada e também por me ensinarem bastante desde o princípio.

Ao pessoal do Laboratório de Citogenética e Mutagênese Ambiental. Aos que já foram – **Cássia e Cleide, Clara, Ana Lúcia, Carmen, Sol, Marjori, Gilmara, Carla, Luciana, Stephano, Marcelo, Renato e Gustavo** –, mas que tive a imensa felicidade em conhecer; e aos que ficam – **Ana Claudia, Giovana, Ana Paula, Raquel, Patrícia, Monica, Aline, Juliana, Flávia, Daily, Danilo Jordão, Paulo, Igor, Danillo Espósito, Cristiano, Leonardo, Gustavo e Vinicius**. Todos, sem exceção, contribuíram para a realização deste trabalho e, da melhor forma, com carinho e amizade. Tive a sorte em conhecer uma galera tão bacana e por isso, sou muito grato a todos vocês.

Aos meus grandes companheiros desde o começo, **Igor, Xitão, Cop e Bollor** – grandes figuras, os quais tenho a imensa gratidão por todo esse tempo de convívio. Parceiros para futebol, cinema, viagem e discussões inúteis.

À **Raquel**, pelos toques e força nas análises e pelas conversas. À **Gi**, pela companhia a qualquer hora e pelos papos que sempre tínhamos e que, ainda, tive o prazer de ser vizinho.

À **Ana Paula e Daniel**, pela amizade e pelas ótimas festas – ótimos anfitriões. Aliás, festa lembra churrasco, o que lembra **Cristiano**, além de um biólogo-filósofo gente boa.

À **Patrícia**, a mais nova casada do laboratório, pelo carinho e amizade. À **Monica**, pessoa ponta firme que topa todas. À **Juliana** e a **Flávia** pela ajuda na análise do microarranjos e pela simpatia.

Ao **Polvilho, Leonardo e Vinicius**, pela companhia e bons momentos.

À **Adriana e Dona Lucia**, por zelarem pela limpeza do laboratório, além da simpatia.

Aos meus primos **Junior, Bruno e Eric**, os meus grandes amigos também.

Aos meus amigos incondicionais, **Claudia, José, Fábio, Marcelo e Larissa**.

Agradeço a **Ana Claudia**, pelo carinho, companheirismo e cumplicidade nesse tempo de ótimo convívio. Se tornou, antes de tudo, uma excelente amiga.

E agradeço e dedico este trabalho aos **meus pais**, por estarem sempre presentes na minha vida e por não medirem esforços para a nossa felicidade. São os meus referências de vida. Às minhas irmãs, **Milena e Alessandra**, a quem muito devo também, e pela convivência maravilhosa e pelo amor com que me tratam. E ao **Bruno e Klebson**.

## ÍNDICE

<b>RESUMO</b>	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>ii</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	
<i>Dano oxidativo e reparo do DNA</i>	<b>1</b>
<i>Doença de Alzheimer</i>	<b>6</b>
<b>OBJETIVOS</b>	
<b>Objetivo geral</b>	<b>12</b>
<b>Objetivos específicos</b>	<b>12</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	
<i>Seleção de pacientes com a doença de Alzheimer</i>	<b>13</b>
<i>Coleta das amostras de sangue e cultura de linfócitos</i>	<b>14</b>
<i>Ensaio do Cometa e tratamento com enzima para a detecção de dano oxidativo no DNA</i>	<b>14</b>
<i>RT-PCR e PCR em tempo real</i>	<b>15</b>
<i>Microarranjos de cDNA</i>	<b>16</b>
<i>Forma de análise dos dados</i>	<b>17</b>
<b>RESULTADOS</b>	
<i>Análise de danos no DNA pelo ensaio do Cometa</i>	<b>20</b>
<i>Expressão gênica por qRT-PCR em Tempo Real</i>	<b>21</b>
<i>Perfis de expressão gênica por microarranjos de cDNA</i>	<b>23</b>
<b>DISCUSSÃO</b>	<b>34</b>
<b>CONCLUSÃO</b>	<b>56</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>58</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>66</b>

## RESUMO

Uma parcela significativa das lesões na molécula do DNA é causada por espécies reativas de oxigênio e a sua produção excessiva e/ou o funcionamento deficiente dos sistemas celulares antioxidantes, que neutralizam a sua ação, é conhecido como estresse oxidativo. Os danos em células normais são prontamente detectados por um sistema de defesa e, em consequência, uma rede intrínseca de sinalizações é ativada, sendo que uma das vias resulta na ativação dos mecanismos de reparo do DNA. O reparo por excisão de bases (BER) parece ser a via preferencial de reparo de bases oxidadas, mas existem outras vias de reparo implicadas na reversão do dano oxidativo.

A doença de Alzheimer (DA), uma patologia causada particularmente por danos oxidativos, acomete atualmente cerca de 25 milhões de pessoas no mundo, sendo o risco aumentado a partir dos 65 anos de idade. Com isso, a necessidade da identificação de fatores de risco, além de fatores protetores relacionados à DA, tornou-se de grande importância. Por outro lado, há também a necessidade de estudos em nível molecular, que possam fornecer informações sobre os mecanismos que levam ao desenvolvimento da doença.

Nesse sentido, foi realizado no presente trabalho, um estudo de expressão gênica transcricional pelo método de microarranjos de DNA, bem como uma análise por PCR em tempo real para uma série de genes envolvidos na resposta ao dano oxidativo no DNA (percepção de danos e reparo do dano), além de outros genes relacionados à doença. Adicionalmente, foram também avaliadas as quebras na fita dupla de DNA causadas por bases oxidadas, em linfócitos de pacientes de Alzheimer (grau moderado) e indivíduos saudáveis, usando-se métodos de detecção de bases oxidadas (8-oxoGuanina).

Entre os vinte genes analisados pelo método de PCR quantitativa em tempo real, apenas a *APOE* mostrou-se induzida, enquanto 19 genes (*ADAM17*, *APEX1*, *APP*, *BACE1*, *OGG1*, *ATM*, *ATR*, *TREX1*, *FEN1*, *FANCG*, *RAD17*, *DUSP*, *ERCC1*, *ERCC3*, *ERCC6*, *HUS1*, *RAD9*, *RAD1*, *PRKDC*) foram reprimidos transcionalmente. Essa repressão verificada para a maior parte dos genes estudados indica que várias vias de sinalização celular ligadas a respostas ao estresse oxidativo, incluindo-se as várias vias de reparo do DNA, podem estar envolvidas na condição DA.

Adicionalmente, a análise de expressão gênica por microarranjos de cDNA indicou uma série de 41 genes significativamente modulados ( $q < 0,06$ ) (dentre eles, *NOTCH1*, *MARK3*, *PAK*, *SMC1L1*) mas para a maioria destes não há relatos na literatura sobre uma possível relação com DA. Por essa razão, o método de microarranjos de cDNA aponta novas vias que possam estar alteradas em DA, o que constitui uma informação importante. Em conjunto, os dados obtidos no presente estudo fornecem uma contribuição relevante, que futuramente poderão contribuir em termos de intervenção terapêutica.



## ABSTRACT

A great amount of DNA molecule lesions is caused by reactive oxygen species and its synthesis in excess and/or malfunctioning of antioxidant cell systems, which neutralize its effects, is known as oxidative stress. Damage in normal cells is readily detected by a defence system and as consequence, a complex signaling pathway is activated, among them DNA repair mechanisms. The base excision repair (BER) seems to be the primary repair pathway in base oxidative damages, however there are other pathways that are involved in their repair.

The Alzheimer's disease (AD), a pathology caused particularly by oxidative damages, hits 25 million people worldwide, and its prevalence increases every 5 years beyond age 65. Therefore, there is an emerging need of finding risk factors, as well as protective factors related do AD. By the other hand, it is also necessary molecular studies, which could provide precious information about the mechanisms which lead to the disease development.

In the present work, it was made a study about transcriptional gene expression by cDNA microarray, as well as Real Time PCR analysis in a series of genes involved in oxidative DNA damage response (sensing and damage repair), and others associated with the disease. In addition, it were also evaluated DNA strand breaks induced by oxidized bases in lymphocytes from Alzheimer's patients (moderate level) and healthy individuals, by oxidized bases (8-oxoguanine) detection methods.

Among the twenty genes tested by the quantitative Real Time PCR assay, only *APOE* was induced, as the remaining 19 (*ADAM17*, *APEX1*, *APP*, *BACE1*, *OGG1*, *ATM*, *ATR*, *TREX1*, *FEN1*, *FANCG*, *RAD17*, *DUSP*, *ERCC1*, *ERCC3*, *ERCC6*, *HUS1*, *RAD9*, *RAD1*, *PRKDC*) were found repressed. This observed inhibition in most of genes studied shows that many cell signaling pathways associated to oxidative stress response, including DNA repair pathways, may be also involved in the AD pathology.

Additionally, the gene expression analysis by cDNA microarrays showed transcriptional alterations in 41 genes ( $q < 0.06$ ) (among them, *NOTCH1*, *MARK3*, *PAK* and *SMC1L1*), but for most of them, there are no reports in the literature about their possible relationship with AD, what brought us new important information. Together, all the data obtained in the preset study provide a relevant contribution, which, in the future, may help on new therapeutic designs.

## INTRODUÇÃO

### ***Dano oxidativo e reparo do DNA***

As células procarióticas ou eucarióticas são continuamente expostas a agentes endógenos e exógenos que danificam o DNA. Os vários tipos de lesões no DNA que resultam dessas exposições são rapidamente detectados, com a subsequente ativação de uma rede intrínseca de sinalizações, conhecida como resposta ao dano. Essa resposta leva à ativação de *checkpoints* do ciclo celular e às vias competentes de reparo do DNA, ou em certas circunstâncias, ao início do processo apoptótico. A resposta ao dano no DNA é um processo coordenado, o qual é executado através de uma série de passos. As lesões são detectadas por proteínas sensoras e, então, os transdutores são ativados para mediar o sinal de dano às proteínas efetoras – durante essas etapas ocorre a modulação de várias vias de resposta às lesões no DNA. Os transdutores também devem estar envolvidos na agregação dos complexos de reparo nos sítios de dano no DNA (Zhou & Elledge, 2000; Shiloh, 2003)

Estima-se que cerca de  $2 \times 10^4$  eventos de dano ocorram em cada célula por dia. Uma parcela significativa das lesões é causada por espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* – ROS) e a sua produção excessiva e/ou o funcionamento deficiente dos sistemas celulares antioxidantes, que neutralizem a ação de ROS, é conhecido como estresse oxidativo.

ROS é constantemente produzida em células vivas (Nelms *et al.*, 1998; Shiloh & Kastan, 2001), sendo que as principais fontes endógenas derivam de processos metabólicos, tais como metabolismo primariamente oxidativo nas mitocôndrias, além dos processos patológicos, como inflamações. Pelo fato de ser um sub-produto da respiração, ROS constitui a classe mais expressiva de agentes tóxicos endógenos em organismos aeróbicos. No entanto, nem sempre se origina de sub-produtos de metabolismo celular, às vezes, podendo ser gerada por oxidases específicas, em resposta a fatores de crescimento e citocinas, atuando como mensageiros secundários em vias específicas de sinalização (Abraham, 2001). Em geral, as ROS em níveis fisiológicos normais desempenham uma função reguladora nas vias de sinalização e expressão gênica (Durocher & Jackson, 2001) e, portanto, a sua produção é de vital importância.

A hipótese dos radicais livres/estresse oxidativo no envelhecimento, a qual foi proposta há anos (Olanow, 1992; Sohal, 1993; Reiter *et al.*, 1994), postula que o acúmulo de espécies reativas de oxigênio relacionado ao envelhecimento resulta em dano na maioria dos componentes celulares: núcleo, DNA mitocondrial, membranas e proteínas citoplasmáticas. O desbalanço entre a produção de radicais livres/ROS e os mecanismos compensatórios desse

estresse, isto é, os sistemas de defesa, podem estar envolvidos na patogênese da maioria das doenças neurodegenerativas, incluindo doença de Alzheimer (DA), como sugerido por alguns autores (Moreira *et al.*, 2006).

Os neurônios parecem ser particularmente vulneráveis ao ataque de radicais livres, pelas seguintes razões: (1) o seu conteúdo de glutathiona, um anti-oxidante natural importante, é baixo (Christen, 2000); (2) as suas membranas contêm uma alta proporção de ácidos graxos poliinsaturados (Hazel & Williams, 1990); e (3) o metabolismo cerebral requer quantidades consideráveis de oxigênio (Smith *et al.*, 1995). O fato de a idade ser um fator de risco crucial em DA, fornece apoio para a hipótese dos radicais livres/estresse oxidativo, pois os efeitos dos ataques pelos radicais livres, particularmente aqueles produzidos por ROS, podem se acumular ao longo dos anos (Benzi *et al.*, 1995). Tais considerações gerais sugerem que os radicais livres estão envolvidos em muitas patologias relacionadas ao envelhecimento, especificamente em DA e outras doenças neurodegenerativas (Christen, 2000).

Em ROS estão englobadas todas as espécies de oxigênio parcialmente reduzidas, denominadas ânion superóxido ( $\cdot\text{O}_2$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), radical hidroxil ( $\cdot\text{OH}$ ) e NO; a função primária dessa última é agir como mensageiro secundário no processo de sinalização e, além disso, interage com  $\cdot\text{O}_2$  para gerar o ânion peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), a molécula responsável pela toxicidade de NO, a qual reside na sua capacidade de alterar diretamente os anéis aromáticos de resíduos de aminoácidos e reagir com sulfidrilas, lipídeos, proteínas e DNA. O ânion de peroxinitrito também pode afetar o estado de energia celular, pela inativação de enzimas-chaves mitocondriais, podendo também levar à liberação de cálcio na mitocôndria – essa atividade ubíqua pode gerar efeitos devastadores na fisiologia e viabilidade celular (Barzilai & Yamamoto, 2004).

Quanto ao potencial mutagênico dos radicais livres, a 8-hidroxidesoxiguanina (8-OH-dG), por exemplo, uma forma oxidada da guanina, é o maior produto oxidativo de dano que pode produzir mutações A-T para C-C ou C-G para T-A, porque ela pareia tanto com adenina quanto citosina (Kohen & Nyska, 2002). Já foi proposto que, diferentemente das lesões nas forquilhas de DNA, as lesões de bases oxidadas, como a 8-OH-dG e 5-hidroxiuracil, são incorporadas pela DNA polimerase na fita recém-sintetizada, o que indica que a 8-OH-dG pode ser pareada com A da fita molde (Mitra *et al.*, 2001).

As bases oxidadas e os sítios AP, bem como quebras de fita simples, induzidas por ROS, com terminações 3'-fosfoglicolato bloqueadas, são reparadas predominantemente pela via de reparo por excisão de bases (*base excision repair* – BER). Em *E. coli*, os genes

específicos mutM, mutY e mutT protegem a fita de DNA da alta mutagenicidade da guanina oxidada. MutM remove a base oxidada das bases pareadas 8-oxoG-C no duplex de DNA. A DNA glicosilase mutY excisa a adenina mal incorporada à 8-oxoG durante a duplicação e a 8-oxodGMPase mutT previne a incorporação da 8-oxo-dGMP na fita nascente de DNA. Os homólogos humanos mutM (*OGG1*), mutY (*MYH*) e mutT (*MTH*) já foram identificados (Charames & Bapat, 2003).

O primeiro passo de BER geralmente envolve o reconhecimento e excisão da base inapropriada. Tais substratos das bases incluem-se a uracila, 3-metiladenina, 8-OH-dG e as formamidopirimidinas. Para executar essa etapa inicial do BER, os organismos são equipados com enzimas denominadas DNA glicosilases (Stivers & Jiang, 2003; Huffman *et al.*, 2005). Elas reconhecem especificamente um determinado número de modificações das bases e catalizam a hidrólise do terminal N-glicosílico (Wilson & Bohr, 2007). O produto resultante é um sítio abásico com uma extremidade fosfodiéster do DNA intacta. Glicosilases monofuncionais, ou seja, proteínas que exibem apenas uma atividade catalítica, normalmente permanecem ligadas ao DNA, talvez para proteger o sítio abásico da clivagem espontânea da fita e/ou servindo como um sinalizador para os eventos de reparo subseqüentes. Algumas glicosilases, como a 8-oxoguanina glicosilase (*OGG1*) e a proteína similar à endonuclease VIII (*NEIL1*) são, no entanto, bifuncionais. Isto é, essas enzimas não só excisam o substrato da fita, como também incisam a fita do DNA imediatamente na posição 3' do produto do sítio AP, por meio de uma reação de eliminação  $\beta$  ou  $\beta,\delta$ . A quebra de fita simples resultante da fase da reação de eliminação gera uma extremidade que necessita da conversão para um grupo 3'-hidroxil normal antes da polimerização e ligação

Após ambas as remoções do substrato pela DNA glicosilase bifuncional, a proteína predominante responsável pela execução do próximo passo, em células de mamíferos, é a endonuclease apurínica 1, *APE1* (Wilson & Barsky, 2001; Demple & Sung, 2005). A *APE1* detém a habilidade de incisar a extremidade 5' do sítio AP e remover o terminal 3' obstrutivo, particularmente os resíduos de aldeído 3'- $\alpha$ - $\beta$ -insaturados.

Uma vez que os terminais do DNA foram processados para conterem um grupo 3'-hidroxil e outro 5'-fosfato e, que os nucleotídeos afetados tenham sido substituídos, o espaço faltante deve ser selado. Essa etapa final é cumprida tanto pela proteína *XRCC1*, quanto pela DNA ligase 3<sup>a</sup> (*LIG3 $\alpha$* ), ou ainda pela proteína individual DNA ligase 1 (*LIG1*) (Tomkinson *et al.*, 2001).

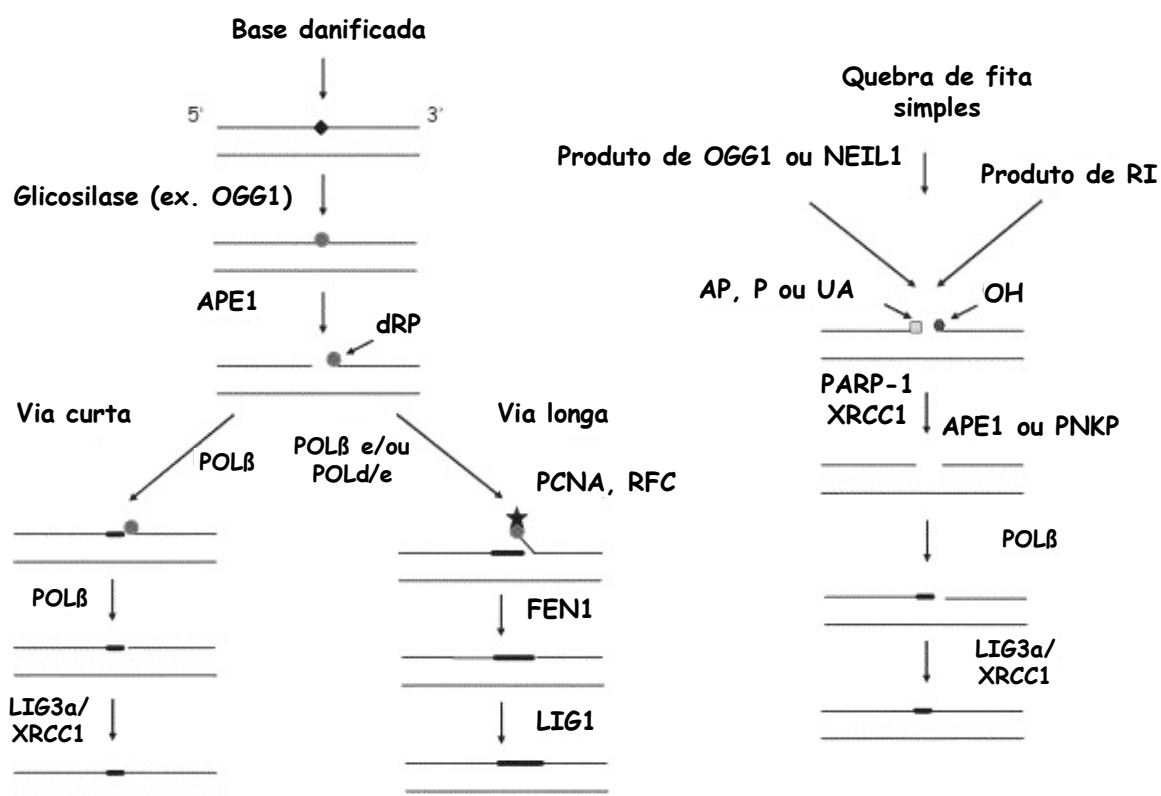
A via detalhada anteriormente, envolvendo a DNA POL $\beta$ , envolve tipicamente a substituição de um único nucleotídeo e, por isso, os pesquisadores referem-se à ela como a via curta de BER (*short-patch BER* – SP-BER). Todavia, em alguns casos, geralmente quando a extremidade 5' oferece dificuldade de excisão pela POL $\beta$  AP liase, a síntese da fita removida é necessária e portanto, a incorporação de múltiplos nucleotídeos ocorre (normalmente entre 2 e 7 nucleotídeos). Essa via foi denominada de via longa de BER (*long-patch BER* – LP-BER) e freqüentemente envolve as polimerases dependentes do antígeno nuclear celular de proliferação (PCNA), isto é, POL $\epsilon$  ou POL $\delta$  (em cooperação com RCF e FEN1) (Figura 1).

Assim como a via anterior, a LP-BER também foi reconstituída com sucesso *in vitro* usando-se um número restrito de proteínas (Klungland & Lindahl, 1997; Matsumoto *et al.*, 1999), as que acreditam ser as principais participantes. Enquanto o papel biológico da LP-BER não é totalmente compreendido, existem possíveis conexões emergentes com doenças em humanos e envelhecimento.

Enquanto deficiências em outras vias de reparo, como por excisão de nucleotídeos (*nucleotide excision repair* – NER) e por erro de pareamento (*Mismatch Repair* – MMR), estão relacionadas ao câncer e outras doenças, ainda não foram caracterizadas doenças relacionadas à deficiência de BER. Entretanto, estudos recentes demonstraram que a atividade reduzida de *OGG1* é o fator de maior risco na formação esporádica de câncer pulmonar em fumantes, associando à deficiência de BER ao desenvolvimento do câncer (Paz-Elizur *et al.*, 2003). Muitas proteínas de NER, em especial XPG (uma endonuclease essencial) também estão envolvidas no reparo da Timina glicol (Tg) *in vivo* (um outro tipo de base oxidada bem caracterizado), mesmo tendo a sua atividade nuclease dispensável. Isso implica na idéia de que o reparo acoplado à transcrição (*transcription-coupled repair* – TCR) de bases oxidadas não funciona via NER, sendo BER a via mais provável.

A via de BER é o mecanismo principal para a remoção de lesões endógenas do DNA e que causa distorções pequenas nas hélices. Além disso, BER é necessário para o reparo de tipos similares de danos de base causados por agentes ambientais, tais como alquilações de nitrosaminas e dano de base por radiações ionizantes (Slupphaug *et al.*, 2003). A via BER é iniciada por perda não-enzimática de base, ou por uma DNA glicosilase. Cada DNA glicosilase é específica para um número limitado de bases danificadas (Lindahl & Wood, 1999; Krokan *et al.*, 2000). As DNA glicosilases podem ser monofuncionais, removendo apenas a base, deixando um sítio abásico intacto (sítios AP), por exemplo, a uracil-DNA glicosilase e alquipurina-DNA glicosilase, ou ainda bifuncionais, pois além de remover a base, ainda tem

uma atividade de liase, clivando o DNA 3'-OH do sítio abásico, como mencionado anteriormente. Pelo menos 12 DNA glicosilases humanas diferentes já foram identificadas, dentre elas a OGG1.



**Figura 1:** Sub-vias de BER. As vias curta e longa estão apresentadas na parte esquerda da figura; a via de reparo da quebra de fita simples está a direita, onde a lesão inicial pode ser tanto um produto de glicosilase ou ação direta de uma agente (ex: radiações ionizantes). O losango representa o dano ou mau pareamento (ex: uracila); círculo cinza = sítio AP ou o grupo dRP após a incisão de APE1; estrela = resíduo abásico gerado pela atividade AP liase da POLβ; linha escura = DNA recém sintetizado.

Pela natureza de ambas as vias de BER, a escolha da via é determinada, em parte, pela natureza da DNA glicosilase e do sítio AP resultante, dependendo também da fase do ciclo celular e localização sub-nuclear do processo (Otterlei *et al.*, 1999).

Os radicais superóxido são eliminados pela superóxido desmutase (*Superoxide Dismutase* – SOD), de onde dois radicais superóxidos e dois prótons geram menos peróxido de hidrogênio e oxigênios reativos. O peróxido de hidrogênio é, por sua vez, convertido à água e

oxigênio pela catalase. As atividades da SOD estão presentes tanto no núcleo, quanto nas mitocôndrias e mesmo extracelularmente.

Nas células em divisão, as respostas relacionadas aos *checkpoints* G1-S, S e G2-M permitem às células danificadas um tempo para efetuar o reparo, particularmente no DNA, ou entrar em apoptose, ou num estado permanente de G0 (Iliakis *et al.*, 2003). Os peróxidos parecem iniciar bloqueios nos *checkpoints* em muitos tipos celulares: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e hidroperóxido de tert-butil induziram uma resposta em G1 que poderia ser atenuada pela aplicação de antioxidantes; concentrações sub-letais de peróxido de hidrogênio em células de fungos induziram a fosforilação dependente de Mec-1 em Rad53 e um atraso no ciclo celular dependente de Rad53, especificamente durante a fase S. A ausência de fosforilação de Rad53 após tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante as fases G1 e G2 é resultante do reparo silencioso de danos oxidativos pela via BER, produzidos nesses estágios. Apenas a ruptura da via BER e o acúmulo e/ou tratamento de intermediários do DNA por vias alternativas de reparo revelam a existência de lesões primárias no DNA, induzidas em todas as fases do ciclo celular pelo peróxido de hidrogênio (Leroy *et al.*, 2001).

### ***Doença de Alzheimer***

A demência senil denominada Alzheimer é uma doença neurodegenerativa crônica que exerce um considerável impacto na saúde pública, visto que a sua incidência continua a crescer com o aumento da longevidade da população (Sramek & Cutler, 1999). A doença de Alzheimer (DA) acomete atualmente cerca de 25 milhões de pessoas no mundo, em número absoluto, e a sua prevalência dobra a cada cinco anos a partir dos 65 anos (Jorm *et al.*, 1987); assim, tem-se uma prevalência de 0,7% no grupo de 60-64 anos, enquanto que no grupo de 90-95 anos essa freqüência aumenta para 38,6%.

A DA não é a mesma daquela descrita na literatura há mais de dez anos, ou seja, uma patologia causada por “fenômenos misteriosos”. Pesquisas no campo da genética e biologia molecular trouxeram muita informação sobre essa doença neurodegenerativa bastante comum. Com o advento de novas formas de abordagem, a identificação de fatores de risco, além de fatores protetores relacionados à DA, tornou-se de fundamental importância. Diversos deles têm sido consistentemente associados ao risco maior da doença, sendo eles: idade, história familiar de demência (van Duijn *et al.*, 1991), fatores genéticos (Saunders *et al.*, 1993; Christen, 2000), trauma craniano (Guo *et al.*, 2000) e doença vascular cerebral prévia (Snowdon *et al.*, 1997).

Alguns genes envolvidos na patogênese de DA já foram identificados; alguns deles estão presentes nas formas precoces do mal (*early-onset*) (entre 10 a 15% dos casos de Alzheimer), antes dos 65 anos de idade, sob a forma de uma doença autossômica dominante familiar, e têm um efeito causal direto: o gene da proteína precursora de amilóide (*amyloid precursor protein* – APP) localizado no cromossomo 21 e os genes da presenilina 1 (*PS1*) e 2 (*PS2*), localizados nos cromossomos 14 e 1, respectivamente. Atualmente, mais de 50 mutações sem sentido diferentes, no gene PS1, já foram descritas em cerca de 100 famílias (Campion *et al.*, 1999). Mutações em APP são menos freqüentes nesses casos familiares, sendo que apenas 7 diferentes mutações sem sentido foram descritas, localizadas nos éxons 16 e 17 de APP, em 23 famílias com DA ou fenótipos relacionados (Campion *et al.*, 1999). Mutações no gene PS2 também já foram encontradas, embora estas sejam muito raras (Lendon *et al.*, 1997).

Para as formas tardias da doença (*late-onset*) – as mais comuns de DA que ocorrem depois dos 65 anos de idade – as quais apresentam padrões muito complexos de herança, o gene da apolipoproteína E (*APOE*), no cromossomo 19, é o único consistentemente associado à doença. Um polimorfismo comum nesse gene ( $\epsilon 4$ ) confere um risco acentuado de DA aos indivíduos portadores (Blacker *et al.*, 2003). O gene da macroglobulina  $\alpha 2$ , localizado no cromossomo 12 e outros genes ainda não identificados, também podem determinar a susceptibilidade nessas formas tardias e esporádicas.

Histologicamente, em DA, o citoesqueleto neurológico se contorce em estruturas denominadas emaranhados neurofibrilares (ENF). Fora da célula, os peptídeos amilóide  $\beta$  ( $A\beta$ ) se agregam em oligômeros, os quais se acumulam e formam depósitos denominados de placas amilóides. Esses depósitos de  $A\beta$  podem ocorrer em qualquer órgão e, normalmente, são grandes e amorfos; já os depósitos de amilóide cerebrais tomam formas delimitadas de placas (Nicoll *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2004).

Parece existir uma cascata de eventos que levam ao processo de amiloidogênese e, mais especificamente, à formação e deposição de um peptídeo grande de amilóide  $\beta$  (de 42 ou 43 aminoácidos). A maioria da  $A\beta$  é composta por um peptídeo designado  $A\beta_{40}$ ,  $A\beta_{40}$ ,  $A\beta_{1-40}$  ou, em alguns casos,  $A\beta_{x-40}$ . Peptídeos com vários terminais amino, todos contendo terminações carboxil idênticas, formam a proporção maior (mais de 95%) da  $A\beta$  produzida pelas células (Naslund *et al.*, 1994). Uma fração menor (menos de 5%) das  $A\beta$  produzidas terminam no resíduo 42 (Naslund *et al.*, 1994). Essa  $A\beta$ , denominada  $A\beta_{1-42}$ ,  $A\beta_{42}$ ,  $A\beta_{42}$  ou  $A\beta_{x-42}$ , é muito mais agregável que a  $A\beta_{40}$ , havendo evidências de que essa forma de peptídeo



inicie a formação dos oligômeros, fibrilas e placas (Younkin, 1995).

Em vários casos em que mutações já foram identificadas nos genes *APP*, *PS1* e *PS2*, em todas houve uma produção acentuada de tal peptídeo (Wyss-Coray *et al.*, 1997). Muitos fatores complementares, incluindo citocinas, fator de crescimento transformador  $\beta 1$  e interleucina 1, parecem estar envolvidos no início do processo de amiloidogênese (Wyss-Coray *et al.*, 1997).

Muitos estudos demonstraram um efeito tóxico direto da amilóide  $\beta$  em culturas de neurônios ou linhagens celulares. Se isso reflete ou não a situação *in vivo* não é conhecido, mas o fenômeno pode fornecer informações importantes para explicar o papel do processo amiloidogênico na patogênese de DA. Behl e colaboradores mostraram que essa toxicidade da amilóide  $\beta$  em células PC12 é suprimida pela vitamina E e por anti-oxidantes em geral (Behl & Sagara, 1997). Em um outro estudo, o autor demonstrou que o peróxido de hidrogênio medeia a toxicidade de amilóide  $\beta$ , sendo que a catalase, que degrada o peróxido de hidrogênio, protege as células da toxicidade da amilóide  $\beta$  (Behl *et al.*, 1994). Esse mesmo grupo selecionou clones de células PC12 resistentes à toxicidade de amilóide  $\beta$  e mostrou que elas continham altas concentrações das enzimas anti-oxidantes catalase e glutathiona peroxidase (Sagara *et al.*, 1996).

Assim como os processos oxidativos podem transformar, *in vitro*, as  $\beta$ -amilóides não-agregadas em agregadas (Dyrks *et al.*, 1992), a própria  $\beta$ -amilóide constitui uma fonte de radicais livres. Esta interage com células vasculares endoteliais, produzindo um excesso de radicais superóxido livres, que podem captar o fator relaxante derivado do endotélio e produzir agentes oxidantes, causando a peroxidação de lipídeos. Segundo os autores, até mesmo esse foco no endotélio vascular, e não nos neurônios, pode apoiar a hipótese de que a  $\beta$ -amilóide atua na produção de radicais livres, exercendo uma função importante nos processos neurodegenerativos (Thomas *et al.*, 1996).

O aumento na atividade de NF- $\kappa$ B protege os neurônios contra a toxicidade da  $\beta$ -amilóide (Barger *et al.*, 1995). Dados novos sugerem que o NF- $\kappa$ B desempenha um papel essencial em doenças neurodegenerativas. Goodman e Mattson (1996) mostraram que a ativação de NF- $\kappa$ B pode constituir uma via de sinalização citoprotetora que induz a expressão de produtos gênicos protetores, como a calbindina e enzimas anti-oxidantes (Goodman & Mattson, 1996). De fato, a exposição de células ao estresse oxidativo, resulta na ativação de NF- $\kappa$ B (Behl & Sagara, 1997) e uma atividade altamente constitutiva desse fator medeia a resistência ao estresse oxidativo em células neuronais (Lezoualc'h *et al.*, 1998). Entretanto,

esses resultados contradizem os apresentados por outros autores (Grilli *et al.*, 1996), os quais discutem a função neuroprotetora da aspirina, a qual é mediada através da inibição de NF- $\kappa$ B. Um outro estudo fornece uma explicação para esses dados contraditórios: a ativação de NF- $\kappa$ B de células gliais é provavelmente neurotóxica, mas o seu envolvimento em neurônios é provavelmente neuroprotetor (Barger *et al.*, 1995).

Como mencionado anteriormente, embora a forma tardia de DA seja caracterizada como uma herança bastante complexa, ao menos um importante fator de risco genético é conhecido em aproximadamente 25% da população com DA e esse é o genótipo *APOE*  $\epsilon$ 4 (Mayeux *et al.*, 1993; Helbecque & Amouyel, 2000). A apoE (codificada pelo gene *APOE*) é uma proteína transportadora de colesterol que atua tanto no sistema vascular, quanto através dos neurônios e se liga, primeiramente, ao receptor do colesterol de baixo peso molecular (*Low Density Lipoprotein receptor* – LDLR) e à proteína relacionada à LDLR (*LDLP-related* – LRP). No cérebro, a apoE é o principal carreador de colesterol, desempenhando fenômenos relacionados à neuroplasticidade, pois eles requerem alterações nos lipídeos da membrana e, portanto, uma função dependente de colesterol.

A forma mais comum de *APOE* é o tipo  $\epsilon$ 3, contendo uma cisteína no resíduo 112 e uma arginina no resíduo 158. No entanto, cerca de 15% dos alelos de *APOE* na população geral são do tipo  $\epsilon$ 4, no qual a cisteína no resíduo 112 é substituída por arginina. Na população dos pacientes com DA a frequência desse alelo é triplicada, cerca de 45% (Mayeux *et al.*, 1993). Em contrapartida, o alelo *APOE*  $\epsilon$ 2 parece proteger contra o desenvolvimento de DA (St George-Hyslop *et al.*, 1994). Esforços para tentar relacionar o *APOE*  $\epsilon$ 4 com o acúmulo de A $\beta$  têm trazido resultados conflitantes: a apoE  $\epsilon$ 3, e não a apoE  $\epsilon$ 4, forma complexos com A $\beta$  que são resistentes à denaturação, segundo LaDu e colaboradores (LaDu *et al.*, 1994).

Um outro modelo que poderia explicar, parcialmente, os efeitos de  $\epsilon$ 4 envolve uma deficiência relativa dessa isoforma como um anti-oxidante, uma vez que esta não tem resíduos de cisteína, presentes em  $\epsilon$ 2 e  $\epsilon$ 3, os quais ajudam a tamponar os efeitos do estresse oxidativo (Miyata & Smith, 1996). Segundo Poirier, a apoE tem um efeito benéfico para a proteção neuronal, mas a isoforma  $\epsilon$ 4 é menos efetiva do que as isoformas  $\epsilon$ 2 e  $\epsilon$ 3, ou seja, apo  $\epsilon$ 4 pode não ser tóxica, mas simplesmente é incapaz de produzir um efeito favorável (Poirier, 1999).

Os processos que clivam a APP também podem trazer fortes indícios sobre o desenvolvimento de DA. A via da  $\alpha$ -secretase é sensível à PKC (Caporaso *et al.*, 1992), MAPK/ERK (Mills *et al.*, 1997), proteína quinase associada a RHO (ROCK) (Pedrini *et al.*, 2005) e proteínas fosfatases 1 e 2A (PP1, PP2A) (Caporaso *et al.*, 1992). Como resultado,

quando ocorre a transdução de sinais que envolvem a ativação de PKC ou MAPK/ERK, ou ainda, a inativação de PP1, PP2A ou ROCK, o metabolismo de APP é drasticamente levado à via mediada por  $\alpha$ -secretase, ao invés da via mediada por  $\beta$ -secretase e formação de A $\beta$  (Buxbaum *et al.*, 1998). Esses resultados evidenciam a competição entre as duas vias e exclusividade mútua. Esse fenômeno, conhecido como clivagem regulada ou segregação regulada de ectodomínio, parece acontecer graças, ao menos em parte, à redistribuição de APP fora dos compartimentos intracelulares e para fora na membrana plasmática, onde o APP pode encontrar a  $\alpha$ -secretase. A  $\alpha$ -secretase, por si mesma, também pode ser redistribuída na membrana plasmática. As estatinas provavelmente diminuem a concentração de A $\beta$ , estimulando a  $\alpha$ -secretase a produzir um padrão de processamento que é indistinguível da clivagem regulada, modulada por PKC e MAPK/ERK (Kojro *et al.*, 2001).

A A $\beta$  é clivada a partir da APP seqüencialmente pela  $\beta$ - e então pela  $\gamma$ -secretase. Entretanto, a formação de A $\beta$  é de ocorrência relativamente rara em cérebro de indivíduos normais; normalmente a APP é clivada primeiro pela  $\alpha$ -secretase, ao invés da  $\beta$ -secretase, inibindo a produção de A $\beta$ . A enzima responsável pela maior parte da clivagem de  $\beta$ -secretase é uma proteinase integral de membrana aspartil, conhecida como enzima de clivagem  $\beta$ -secretase (BACE). A identidade das  $\alpha$ -secretases também são conhecidas – ADAM10 (uma desintegrina e metaloproteinase) (Lammich *et al.*, 1999) e ADAM17, também conhecida como enzima conversora de fator de tumor de necrose (TACE) (Buxbaum *et al.*, 1998), ambas capazes de clivar APP no sítio de clivagem da  $\alpha$ -secretase, sendo que a ADAM9 (Hotoda *et al.*, 2002) também parece participar.

Com o advento de novas formas de abordagem, a identificação de fatores de risco, além de fatores protetores relacionados à DA, tornou-se de fundamental importância. Diversos deles têm sido consistentemente associados ao risco aumentado da doença, tais como a idade, história familiar de demência, fatores genéticos, trauma craniano e doença vascular cerebral prévia.

A inativação de um transdutor que medeia a resposta ao dano no DNA pode levar ao acúmulo de danos, perda da homeostase e alterações no estado redox celular, sendo que perturbações no balanço de espécies reativas de oxigênio (ROS), resultando em estresse oxidativo, constituem um denominador comum das síndromes de instabilidade genômica, que refletem um defeito nas respostas aos danos no DNA (Moreira *et al.*, 2006). Assim, um estudo enfocando os níveis de expressão gênica diferencial para uma série de genes-alvo mostra-se relevante para melhor caracterizar a DA. Para a doença de Alzheimer, dados na literatura

apontam para alguns genes-alvo que possam estar relacionados à patologia: o *APP*, *PS1* e *PS2* são genes cujos produtos participam diretamente na produção e deposição de amilóides  $\beta$  (placas amilóides), peptídeo comprovadamente tóxico às células humanas. Parece existir uma cascata de eventos que levam ao processo de amiloidogênese. Ainda, em trabalhos em que foram encontradas mutações nos genes *APP*, *PS1* e *PS2*, verificou-se uma produção acentuada de tal peptídeo (Wyss-Coray *et al.*, 1997).

Entretanto, somente um fator de risco genético é conhecido nesses casos, relacionado ao genótipo *APOE*  $\epsilon 4$  (sendo a apoE codificada pelo gene *APOE*). Esse isótipo confere um risco acentuado de Alzheimer aos indivíduos portadores (Blacker *et al.*, 2003).

---

## OBJETIVOS

### *Objetivos gerais*

O objetivo do presente trabalho foi o de analisar a expressão diferencial de genes envolvidos na resposta ao dano oxidativo no DNA, bem como avaliar o efeito do estresse oxidativo na produção de quebras na fita de DNA, causadas por bases oxidadas, em linfócitos de pacientes de Alzheimer, grau moderado, comparados a um grupo controle de indivíduos sadios.

### *Objetivos específicos*

- Avaliar o efeito do estresse oxidativo na produção de quebras na fita de DNA, causadas por bases oxidadas, em linfócitos de pacientes DA e controles.
- Comparar os níveis de expressão (pelo método de qPCR) de uma série de 20 genes de reparo e percepção de dano oxidativo em linfócitos de pacientes DA e controles;
- Avaliar os perfis de expressão gênica em linfócitos de pacientes com Alzheimer e contextualizá-los num espectro mais amplo, por meio da análise por microarranjos de cDNA, a fim de verificar a existência de uma possível associação destes aos processos celulares verificados em DA, comparados aos indivíduos sadios;
- Detectar, por meio de estudos de perfis de expressão e análise de agrupamento gênico (dados obtidos por microarranjos), genes ou classes de genes com expressão significativamente alterada, relativamente aos controles, que possam discriminar o grupo de pacientes DA com o grupo controle.

## MATERIAL E MÉTODOS

### ***Seleção de pacientes com a doença de Alzheimer***

Os pacientes escolhidos para o presente estudo já sofreram uma triagem e seleção (para um estudo anterior, tese de doutorado do Dr Charlys B. Nogueira) nos ambulatórios de geriatria (AGER), ambulatório de geriatria de pacientes de alta dependência (GEAD) e ambulatório de triagem em geriatria (GERI) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Universidade de São Paulo, com consentimento prévio da comissão de ética em pesquisa competente.

O trabalho foi submetido à avaliação pelo comitê de ética local, do HC-FMRP e aprovado (Anexo). As amostras de sangue (dos pacientes e controles) foram coletadas com o consentimento dos doadores e, preservando a liberdade dos mesmos em retirar o seu consentimento a qualquer momento, sem que isso trouxesse qualquer prejuízo a eles, sendo mantida, também, a privacidade dos mesmos. O grupo de pacientes DA envolveu 12 mulheres de sexo feminino, com idade média de  $78 \pm 6,36$  anos e escolaridade entre um e oito anos. Todas as participantes foram submetidas, no estudo anterior, à entrevista estruturada ENEDAM (Entrevista Estruturada para o Diagnóstico de Demência do tipo Alzheimer, Demência por Múltiplos Infartos e Demência de Outras Etiologias) (Zaudig *et al.*, 1991; Zaudig, 1992), para auxílio no diagnóstico de DA. Para excluir outras causas de demência, também foram realizados o Mini Exame do Estado Mental (MEEM) (Folstein *et al.*, 1975), o teste do relógio, o teste de fluência verbal e a Escala Clínica de Demência (*Clinical Dementia Rating* – CDR) (Hughes *et al.*, 1982).

As voluntárias apresentaram diagnóstico de DA provável, com base nos critérios propostos pelo DSM-IV (Manual de Diagnóstico e Estatística de Transtornos Mentais), DSM-III-R (Idem – 3ª Ed revisada) (Association, 1987), NINCS-ADRDA (*National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's disease Related Disorders Association*) (McKhann *et al.*, 1984) e CID-10 (Código Internacional das Doenças) (World Health Association, 1992). Além disso, foram selecionadas apenas as voluntárias com escore isquêmico de Hachinski (Hachinski *et al.*, 1975) abaixo de quatro (valores acima desse limiar referem-se à demência por múltiplos infartos). Todas as pacientes também passaram por uma série de exames de rotina (para avaliação de síndromes demenciais, visando excluir outras causas de demência que não a DA: tomografia computadorizada de crânio sem contraste, hemograma completo, dosagem de sódio, potássio, cálcio total e ionizado, provas de

função renal e hepática, enzimas hepáticas, hormônios tireoidianos e sorologia para sífilis e HIV. Todas as avaliações foram feitas por um médico especialista responsável da própria instituição (HC-FMRP). Vale ressaltar ainda que, por se tratar de um grupo de DA moderado provável, todas as pacientes estavam sob medicação de inibidores de acetil-colinesterase A (Donepezil ou Rivastigmina), conduta comum nos ambulatórios de geriatria e demência.

Para a integração do grupo controles, 12 indivíduos sadios, também do sexo feminino, foram selecionados, com idade média de  $76 \pm 4,31$  anos, os quais não apresentavam queixas de memória no momento da avaliação e foram diagnosticados normais do ponto de vista cognitivo, por avaliação clínica com anamnese detalhada. Todos os indivíduos controles também foram submetidos ao Mini Exame do Estado Mental (MEEM) (Folstein *et al.*, 1975), o teste do relógio e o teste de fluência verbal (Hughes *et al.*, 1982).

### ***Coleta das amostras de sangue e cultura de linfócitos***

Por ocasião do retorno das pacientes ao ambulatório e após a consulta especializada, juntamente com as entrevistas já descritas, as amostras de sangue de ambos os grupos foram coletadas. Para todos os testes, foram colhidos 20 mL de sangue/indivíduo, por punção venosa, usando tubos Vacutainer (Beckton & Dickinson, EUA) contendo EDTA e os linfócitos foram imediatamente separados, utilizando-se Histopaque 1077, segundo orientações do fabricante (Sigma Chemical Co, USA). Uma pequena alíquota de sangue total (cerca de 500  $\mu$ L) foi reservada durante a separação dos linfócitos, para a execução dos testes do Cometa.

### ***Ensaio do Cometa e tratamento com enzima para a detecção de dano oxidativo no DNA***

Logo após a retirada do sangue, 20  $\mu$ L foram acrescidos a 240  $\mu$ L de agarose de baixo ponto de fusão (37°C) 0,5%, misturando-se levemente. O material foi então, transferido para duas lâminas recém-preparadas com a primeira camada de agarose de ponto de fusão normal 1,5%. As lamínulas foram colocadas sobre o material e em seguida, as lâminas foram levadas à geladeira por 5 minutos, quando as lamínulas foram retiradas. Em seguida, as lâminas serão mergulhadas em solução de lise – contendo NaCl 2,5M; EDTA 100mM; Tris 10 mM; DMSO 10%; Triton X-100 1%, pH 10 – recém preparada, por 2 horas, permanecendo a 4°C durante todo o tempo em solução de lise (por até 5 dias).

Depois da lise, as lâminas foram imersas, 2 vezes, em tampão F [(HEPES 40 mM; KCl 0,1 M; EDTA 0,5 mM e 0,2 mg/mL (pH= 8.0)] por 5 minutos cada, e a 4°C. A enzima hOGG1 foi diluída em 50 mL de tampão F, em diluições previamente estabelecidas para a aquisição da

maior percentagem de quebras possíveis – o equivalente à cerca de 0,08 U por gel. Em seguida, as lâminas foram cobertas por lamínulas e incubadas em uma câmara úmida por 10 minutos, a 37°C.

Ao final desse tempo, as lamínulas foram removidas e as lâminas mergulhadas em solução tampão de eletroforese (NaOH 300 mM; EDTA 1mM, pH=13) por 20 minutos, a 4°C. Transcorrido esse tempo, as lâminas foram levadas para a cuba de eletroforese, preenchendo-a com solução tampão até cobrir as lâminas e, enfim submetidas à uma eletroforese a 25V/300mA por mais 20 minutos. Depois disso, as lâminas foram imediatamente imersas em solução de neutralização (Tris 0,4M; Ph 7,5) por 15 minutos, à temperatura ambiente e então, coradas com 50 mL de iodeto de propídio (10 mg/mL) e contadas.

A quantificação das células foi feita através do *software* CometScore ver.1.5 (TriTrek Corp./USA) e os dados submetidos à análise estatística. Foram contadas um total de 75 células/indivíduo.

### **RT-PCR e PCR em tempo real**

Para os experimentos de RT-PCR e PCR em tempo real, foram utilizadas as amostras de 5 indivíduos de cada grupo. A qualidade e integridade do RNA foram verificadas anteriormente, bem como a reação de RT-PCR, através da eletroforese de gel de agarose denaturante (*SIGMA*, EUA).

As extrações de RNA total de todas as amostras foram feitas com o reagente Trizol (Gibco BRL) conforme as instruções do fabricante e a quantificação do RNA extraído também foi feita, por um espectrofotômetro *GeneQuant* (*Amersham*, EUA). Para remover quaisquer resquícios de DNA da amostra de RNA, foi usado o *kit Deoxyribonuclease I, Amplification Grade* (*Invitrogen*).

Para a RT-PCR, foi utilizado o *kit Superscript III Reverse Transcriptase* (*Invitrogen*); adicionando 1µL de *oligo DT primer* (250ng/µL) aos RNAs provenientes das amostras da reação com a DNase e incubados a 70°C, por 10 minutos e, ao final, colocados no gelo. Adicionou-se aos tubos um mix contendo 4µL de *First-strand buffer 5X*, 2µL de DTT 0,1M, 1µL de dNTP 10mM e 1µL de *Superscript III RT 200U/µL* (*Invitrogen*), incubando-se por 50 minutos, a 50°C e, no final, à uma temperatura de 70°C por 15 minutos. Ao final da reação foi realizada uma reação de PCR convencional para um gene constitutivo, a ACTβ, a fim de testar a integridade das amostras de cDNA.



As reações de PCR em tempo real foram preparadas a partir de um *mix* contendo 9µL de água DEPC, 12,5µL de *SYBR Green* (*Applied Biosystems, Foster City*), 1,25µL de *forward primer* e 1,25µL de *reverse primer* para cada gene a ser testado e 1µL do produto de PCR das amostras de cDNA e, todas elas foram preparadas em placas de polipropileno para 96 reações (*Applied Biosystems, Foster City*), cobertas com adesivos para microplacas resistentes a altas temperaturas (*Applied Biosystems, Foster City*). Na tabela 1 consta a relação dos pares de *primers* utilizados nessa metodologia.

### **Microarranjos de cDNA**

As análises dos perfis de expressão gênica apresentadas pelos linfócitos coletados foram feitas utilizando lâminas de vidro para microarranjos contendo 4.300 seqüências (em duplicatas) adquiridas a partir de uma biblioteca humana com cerca de 9.000 clones proveniente do consórcio IMAGE (<http://image.llnl.gov>), gentilmente disponibilizada pelo Prof. Dr. Geraldo A. S. Passos e pela Dra. Catherine Nguyen do *Centre d'Immunologie Marseille-Luminy*, Marseille, França e preparada de acordo com o protocolo descrito por Hegde e colaboradores (Hegde et al, 2000).

Os microarranjos em lâmina de vidro foram preparados por um robô *array spotter* e as imagens adquiridas por um *array scanner*, ambos da linha *Generation III Microarray System* (Amersham Pharmacia Biotech – MD), seguindo as recomendações do fabricante.

As sondas complexas de cDNA foram preparadas a partir de amostras de RNA extraídas de linfócitos de pacientes com Alzheimer e seus respectivos controles e, em seguida, foi realizada transcrição reversa com 10 µg de RNA total de cada amostra, na presença de fluorocromos Cy3 e Cy5 (CyScribe Post Labelling Kit, Amersham Biosciences, England) e oligo dT12-18 como *primer*.

O RNA de referência foi composto por RNA extraído de três diferentes linhagens celulares: U343 MG-a (linhagem humana de glioma), HeLa (células de carcinoma cervical) e Jurkat (células T-leucêmicas). O RNA dessas células foi extraído e misturado em iguais proporções, sendo estocado a -80°C. Esse *pool* de referência garante que cada hibridação no microarranjo seja realizada com uma amostra de referência idêntica, marcada com Cy3. Esta é hibridada com amostras provenientes dos controles ou paciente, marcadas com Cy5.

As sondas complexas foram purificadas com colunas GFX™ (Amersham Pharmacia Biotech), para remoção dos nucleotídeos e dos fluorocromos não incorporados. As lâminas de

**Tabela 1:** Lista de *primers* utilizados nas reações de RT-PCR (*ACTB*, especificamente) e qPCR em Tempo Real.

	<b>Forward Primer</b>	<b>Reverse Primer</b>	<b>Amplicon</b>
<b><i>ACTB</i></b>	GATGAGATTGGCATGGCTTT	ATTGTGAACTTTGGGGGATG	141
<b><i>ADAM17</i></b>	CTTTCTGCGAGAGGGAACAG	CATCGACATAGGGCACACAG	111
<b><i>APEX1</i></b>	ATATTGCTTCGGTGGGTGAC	GCTCTGTCCTGAGCTCATCC	115
<b><i>APOE</i></b>	CACTGTCTGAGCAGGTGCAG	TCCAGTCCCGATTTGTAGGC	112
<b><i>APP</i></b>	GCAGAACGGCTACGAAAATC	ACACCGATGGGTAGTGAAGC	118
<b><i>ATM</i></b>	TGACTTTTCAGGGGATTTGG	TAGGAATCAGGGCTTTTGA	147
<b><i>ATR</i></b>	GACTCAATGGTATCTACTGTGG	GATTCAAAGTGCATTACAGCTC	136
<b><i>BACE1</i></b>	TAACCCCTAAGCTCCAGGT	GAGGAAGATTTGGGGAAAG	105
<b><i>DUSP1</i></b>	GAAGGACATTTGGGCTGTGT	CGCTTTTGGACTGAGAGAGG	113
<b><i>ERCC1</i></b>	CCTATGAGCAGAAACCAGC	TGTTCCAGAGATCCAAATGTG	144
<b><i>ERCC3</i></b>	GCAAATCTGCCATTTCTAAGAC	CATAGAAGTCAAACAGGTCCA	110
<b><i>ERCC6</i></b>	GGGCAAGACCATCCAGATAA	ATTCCTTCACCCACTGATGC	146
<b><i>FANCG</i></b>	CTGTTCTTCCCTTGGAGCTG	TCTCTAGGCTCCGCTGGATA	107
<b><i>FEN1</i></b>	CCAGCTCTTCTTGGAACCTG	CGCTCCTCAGAGAAGTCTT	120
<b><i>HUS1</i></b>	AGCTGCAGCATTGGAGTCT	CAGAAGGAGCTCCCAGCTAA	119
<b><i>OGG1</i></b>	AGAAATTCCCAAGCACCTT	CCTGGCCTTTGAGGTAGTCA	106
<b><i>PRKDC</i></b>	ATAGGTTTCAACATCGGAGAC	GCTCCTCAATGCTCTGTG	147
<b><i>RAD1</i></b>	ACCCTTTGATGCTGTTCTTG	TGGTGCTGCAGAAATCAAAG	102
<b><i>RAD17</i></b>	GAAGCTAACAAGAATGGAGGA	GGCTGTTTATTGCACTTCTG	102
<b><i>RAD9</i></b>	CCAGCTGGCTGTCACTGTAA	TAGTTCAGGGCCAAGTCTGG	105
<b><i>TREX1</i></b>	TGACGGACTGTGAAGAGG	GTTGATGTGGTAAGGAAAGGA	142

microarranjos foram hibridadas com as sonda complexas fluorescentes na presença de *Hybe Solution*, segundo o protocolo que acompanha os reagentes (Amersham Pharmacia Biotech).

### **Forma de análise dos dados**

#### *Ensaio do cometa*

Foram analisadas 75 células/cultura/indivíduo, sendo observadas as células com contorno circular (núcleos sem danos de DNA) ou em forma de “cometa” (núcleos com danos no DNA), no qual a extensão da cauda reflete a distância de migração da fita de DNA danificada. Para a análise dos danos no DNA, optou-se pela quantidade de DNA na cauda (em %) e o momento da cauda, ambos os parâmetros oferecido pelo *software*.

#### *PCR tempo real*

Com a obtenção dos valores de  $C_T$ , fornecidos pelo *software Gene Amp 7500 Sequence Detection System*, determinados individualmente e manualmente para cada gene, os dados foram exportados para uma planilha do *Excel (Microsoft Inc.)* para análise. O método utilizado para a análise foi feito de acordo com o proposto por Livak & Schmittgen (Livak & Schmittgen, 2001).

#### *Microarranjos de cDNA*

Os procedimentos de filtragem, normalização e análise dos resultados obtidos para os experimentos de microarranjos de cDNA, foram realizados no ambiente estatístico R (Ihaka & Gentleman, 1996), e no programa MEV.

A quantificação da imagem foi feita pelo *software Spot* (<http://spot.cmis.csiro.au/spot/>, CSIRO, Austrália). A filtragem, normalização e análise dos dados foram submetidas ao ambiente estatístico R (Ihaka, 1996), de acordo com as instruções do pacote KHT (<http://www.biotech.kth.se/molbio/microarray/7userguide/usersguide.htm>), que implementa bibliotecas de funções para a filtragem, normalização e análise de dados provenientes de experimentos de microarranjos de cDNA.

Os valores de *background* de cada amostra foram subtraídos e os *spots* foram avaliados pela sua circularidade e pela média x desvio padrão e, posteriormente, foi realizado o método de normalização *Lowess* e estabelecimento dos valores M, pelo valor de MAD (*Median Absolute Deviation*) (Yang & Speed, 2002). Os dados normalizados foram exportados para o formato MEV e analisados pelo *software MEV* (<http://www.tm4.org/mev.html>), sendo a análise estatística processada por ANOVA e SAM (*Significance Analysis of Microarrays*).

As informações sobre a localização dos genes e suas funções biológicas foram obtidas a partir de S.O.U.R.C.E. (<http://genome-www5.stanford.edu/cgi-bin/source/>) e NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). O método de *False Discovery Rate* (FDR) foi usado para quantificar o erro das amostras como um todo e, em seguida, aplicado para ajustar os valores p estatísticos para a expressão do erro (Smyth, 2004). Os genes considerados significativamente modulados foram selecionados para  $FDR \leq 0,061$ .

Adicionalmente, foi também realizada uma análise de agrupamento hierárquico dos dados, usando-se o programa MEV, sendo utilizados os valores normalizados, obtidos de cada duplicata experimental, para aumentar o refinamento do agrupamento gênico. Nessa análise, foram selecionados 187 genes indicados pelo SAM (com  $FDR \leq 0,176$ ).

## RESULTADOS

### ***Análise de danos no DNA pelo ensaio do Cometa***

O ensaio do cometa foi aplicado para avaliar a indução e processamento de danos no DNA em amostras de um total de 24 mulheres não-fumantes, sendo que entre estas, 12 pacientes apresentavam a doença de Alzheimer (grupo DA) - grau moderado, e 12 não apresentavam a doença (grupo controle).

Dentre as diversas variáveis fornecidas pelo software CometScore™ ver 1.5 (TriTrek Corp./USA), optou-se pela quantidade de DNA na cauda do cometa. Paralelamente, foram realizados testes estatísticos com o momento da cauda (*Tail Moment*) (dados não apresentados), mas com essa variável não foi possível realizar qualquer análise estatística. De qualquer forma, tanto os valores da quantidade de DNA na cauda, quanto o momento da cauda, obtidos para cada grupo, encontram-se na tabela 2, bem como o gráfico (Figura 2).

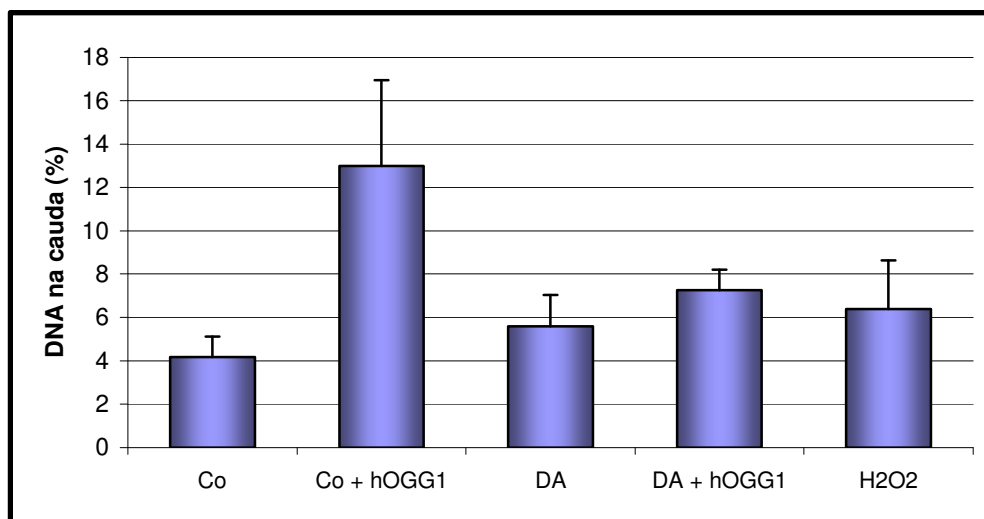
Os resultados obtidos demonstraram que em quase todos os grupos (exceção na comparação entre o grupos DA e Co) houve uma diferença significativa entre eles ( $p < 0,01$ ), quando submetidos ao teste de ANOVA,  $\alpha = 0,05$ , seguido pelo método de Student-Newman-Keuls, para a comparação múltipla entre todos os grupos pareados. Anteriormente, em uma análise preliminar, todos os grupos passaram pelo teste de normalidade e de igualdade de variâncias.

Entretanto, nesse teste, os grupos controle (4,18% de DNA na cauda) versus pacientes Alzheimer (5,59%) não apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,01$ ) entre eles. Entretanto, quando os dados foram submetidos ao teste-t, a análise pareada mostrou diferenças significativas ( $p = 0,02$ ) entre os grupos DA e controle, embora o poder do teste tenha sido menor ( $P = 0,60$ ), comparado ao obtido no teste de ANOVA ( $P = 1,0$ ). Assim, embora os resultados obtidos por ANOVA apresentem um maior nível de confiança, o Teste-t indicou claramente uma tendência dos pacientes Alzheimer a apresentarem um maior nível de danos no DNA.

Após o tratamento com a enzima hOGG1, específica no reparo de alguns danos oxidativos, ambos os grupos demonstraram diferenças significativas ( $p < 0,01$ ) quando submetidos ao teste-t pareado. Para o grupo controle (4,18%), a percentagem de DNA na cauda aumentou cerca de 3 vezes (12,99%), enquanto que para o grupo DA (5,59%), a diferença foi bem menor (1,3 vezes – 7,25%).

**Tabela 2:** Valores das médias encontradas para as duas variáveis: quantidade de DNA na cauda (% DNA) e *Tail Moment* (TM) em cada grupo de indivíduos, controle (Co) e pacientes (DA). DP= desvio padrão e EP= erro padrão.

		Média	DP	EP
Co	% DNA	4,18	0,94	0,30
	TM	2,71	1,88	0,59
Co + hOGG1	% DNA	12,99	3,96	1,25
	TM	20,93	11,57	3,66
DA	% DNA	5,59	1,44	0,46
	TM	4,44	2,32	0,74
DA + hOGG1	% DNA	7,26	0,96	0,30
	TM	5,96	1,88	0,59
H2O2	% DNA	6,39	2,25	0,71
	TM	4,29	2,29	0,73



**Figura 2:** Percentagem de DNA na cauda do cometa, em grupos controle não-tratados com a enzima hOGG1 (Co) e tratados (Co + hOGG1) e pacientes DA não tratados (DA) e tratados (DA + hOGG1). Com a exceção da comparação entre Co e DA, as demais comparações apresentaram diferenças estatisticamente significativas ( $p \leq 0,01$ ). (Grupo Co: n= 12; Grupo DA: n= 12)

Dentre todos os grupos estudados, as células de pacientes controles submetidas ao tratamento com a enzima foram mais sensíveis, mesmo em relação ao grupo de tratamento com o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Observa-se também que no teste com a hOGG1 e sob condições de tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, os linfócitos de pacientes DA apresentaram níveis maiores de danos que o controle positivo. Uma vez que a enzima hOGG1 reconhece e cliva os sítios que apresentam produtos de oxidação na molécula do DNA, os resultados sugerem que uma grande parte dos danos gerados nas células de ambos os grupos experimentais deve-se aos danos oxidativos, embora tenha sido demonstrado que os pacientes DA apresentam baixos níveis de dano relativamente aos controles (Figura 2).

Embora tenham sido observadas mudanças nos resultados sob condições de tratamento com a enzima, principalmente no grupo controle, tais danos não foram tão drásticos, uma vez que o maior índice obtido foi inferior a 13% de DNA na cauda do cometa.

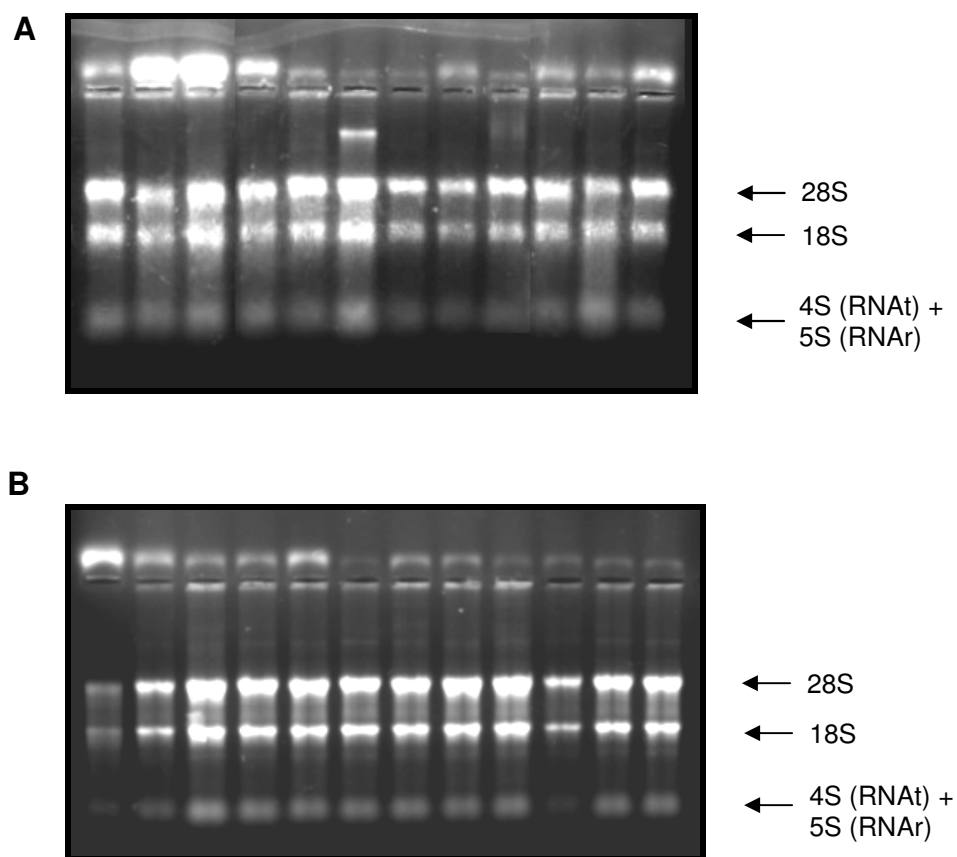
Embora os valores obtidos para o controle positivo (tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) tenham sido relativamente baixos, em termos de produção de danos no DNA, a análise das amostras de ambos os grupos mostrou a eficiência do método no sentido de detectar a geração de danos no DNA.

### ***Expressão gênica por qRT-PCR em Tempo Real***

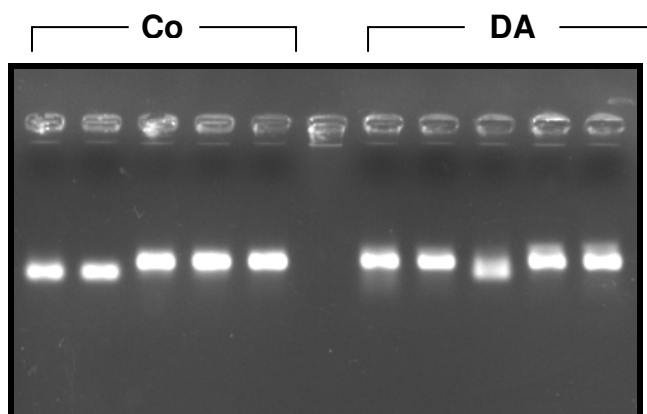
As amostras de RNA total obtidas dos linfócitos de indivíduos controles e pacientes DA foram submetidas à eletroforese em gel de agarose desnaturante (1,5%) para a avaliação da sua integridade (figura 3). Foi também avaliada a qualidade dos produtos obtidos nas reações de RT-PCR, utilizando-se o par de *primers* para actina β como controle endógeno (figura 4).

Um conjunto de 20 genes foi avaliado quanto à expressão gênica transcricional em amostras de pacientes DA e controles. Foram determinados os níveis de expressão para os genes potencialmente envolvidos na patogênese de Alzheimer, principalmente os relacionados às vias de sinalização de danos, reparo e particularmente alguns genes descritos como relacionados à doença (tabela 3 e figura 5). Com a exceção de *APOE* (induzido) e *DUSP1* (inalterado), todos os demais genes mostraram um perfil de repressão da transcrição.

O gene *APOE*, cuja função se relaciona principalmente ao transporte de colesterol e apresenta alguma associação com a doença de Alzheimer, mostrou um *fold-change* (FC) de cerca de 0,51, sendo que *DUSP1*, que codifica uma fosfatase envolvida na resposta ao estresse ambiental, praticamente não foi modulado, apresentando FC = -0,05.



**Figura 3:** Avaliação da integridade das amostras de RNA total. Eletroforese em gel de agarose 1,5%, evidenciando o fracionamento do RNA total das amostras dos indivíduos controles (A) e pacientes Alzheimer (B).



**Figura 4:** Avaliação da qualidade de reação da RT-PCR. Eletroforese em gel de agarose 1,5%, evidenciando a amplificação do gene ACT $\beta$  (controle endógeno) nos grupos controle (Co) e Alzheimer (DA).



Os genes restantes, sabidamente relacionados à patologia de Alzheimer, mostraram-se reprimidos, sendo eles *ADAM17* (FC = -1,38), *APP* (FC = -1,84) e *BACE1* (FC = -3,76). Os demais genes também apresentaram um padrão similar. Entre os participantes na percepção e sinalização de danos, notou-se a repressão de *ATM* (FC = -5,94), *ATR* (FC = -3,64), *TREX1* (*ATRIP*) (FC = -1,86), *PRKDC* (FC = -1,84), *RAD17* (FC = -1,84) e dos genes cujos produtos formam o complexo 9-1-1: *RAD9* (FC = -0,95), *HUS1* (FC = -1,48) e *RAD1* (FC = -0,63).

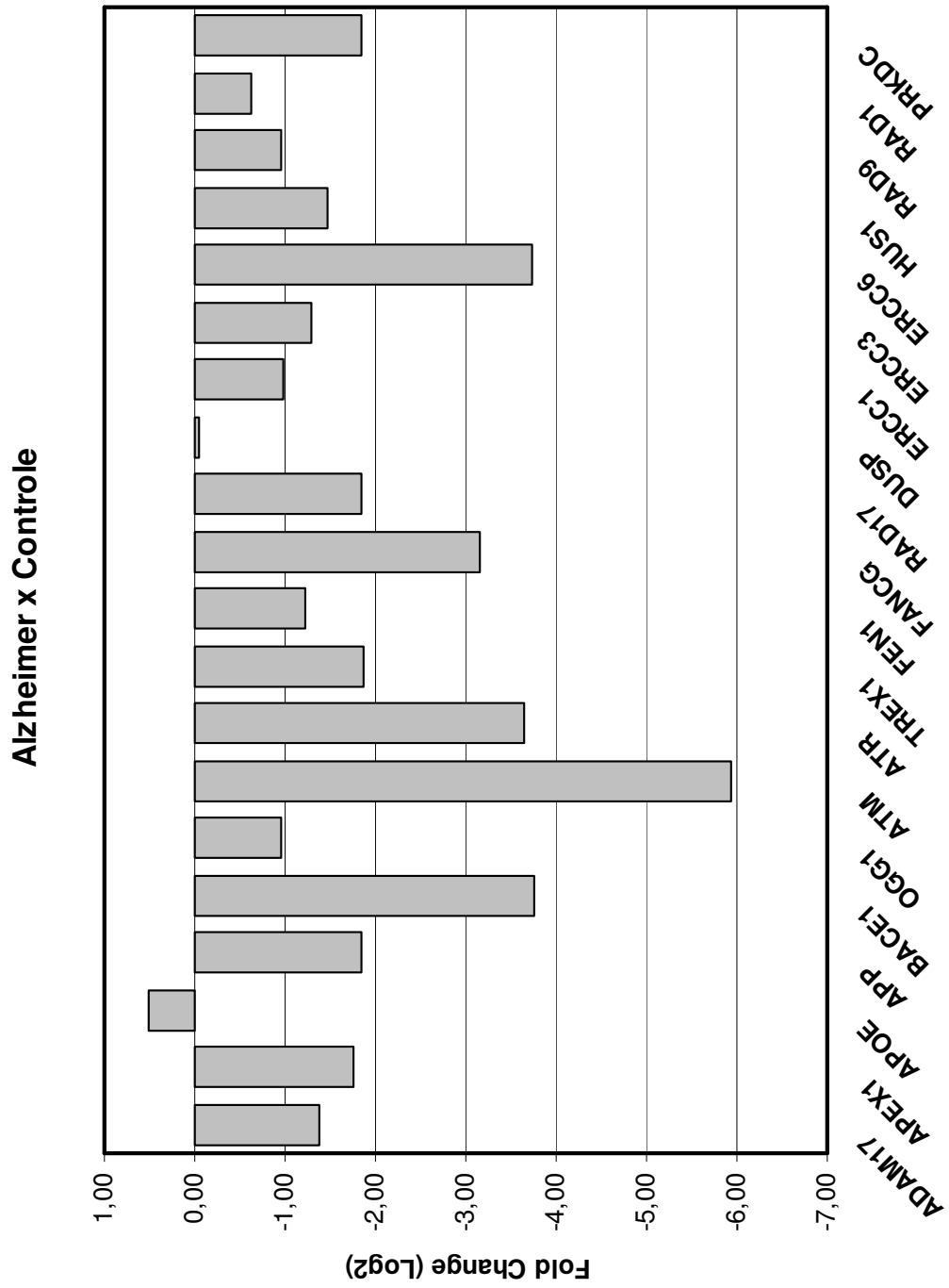
Com o intuito de tentar estabelecer alguma relação nos padrões de expressão entre genes sinalizadores e de reparo, foram avaliados também os perfis de expressão de alguns envolvidos em certas vias de reparo, tais como o *APEX1* (FC = -1,76), *OGG1* (FC = -0,95), *FEN1* (FC = -1,22), *FANCG* (FC = -3,15), *ERCC1* (FC = -0,97), *ERCC3* (FC = -1,30) e *ERCC6* (FC = -3,73) (tabela 3 e figura 5).

Nessa análise nota-se que a expressão de vários genes é sensivelmente diferente nos pacientes DA em comparação aos indivíduos controles, particularmente para os genes *BACE1*, *ATM*, *ATR*, *FANCG* e *ERCC6*, os quais mostraram um perfil de repressão mais intenso, numa razão superior a 3 vezes nos pacientes. Ao contrário, alguns genes mostraram um menor grau de repressão, com FC < -1,5, como *ADAM17*, *OGG1*, *FEN1*, *ERCC1*, *ERCC3*, *RAD9* e *RAD1*.

### **Perfis de expressão gênica por microarranjos de cDNA**

Nos experimentos de microarranjos, os perfis de expressão de 4224 genes foram avaliados simultaneamente nas amostras provenientes de linfócitos de sangue periférico de pacientes com Alzheimer e indivíduos controles normais. Nesse ensaio, foram analisados 8 indivíduos de cada grupo.

Para caracterizar os genes diferencialmente expressos para ambos os grupos estudados, os valores correspondentes aos sinais de hibridação foram normalizados, sendo posteriormente submetidos à análise estatística pelo método SAM. Este apontou os genes significativamente modulados entre os dois grupos experimentais, para FDR ≤ 0,061 (figura 6). Foram encontrados 43 genes significativamente expressos, sendo 41 induzidos e apenas 2 reprimidos, em pacientes DA em comparação ao grupo controle (Figura 7). A identidade desses genes, assim como as suas funções (apenas para os genes conhecidos) estão representadas na tabela 4. Contudo, os genes modulados não apresentaram altos níveis de modulação transcricional, uma vez que a magnitude de



**Figura 5:** Perfis de expressão gênica (valores relativos em *fold-change*) para a comparação entre pacientes Alzheimer e indivíduos controles, analisados por qRT-PCR em Tempo Real. O controle endógeno utilizado foi *ACTB* para todos os genes (Paciente, n= 5; Controle, n= 5).

**Tabela 3:** Resultados da análise de expressão gênica analisada por qPCR em Tempo Real, ilustrados pelos valores de *fold-change* (em base  $\log_2$ ), em amostras de RNA obtidas de pacientes DA e controles (utilizou-se o gene *ACTB* como controle endógeno).

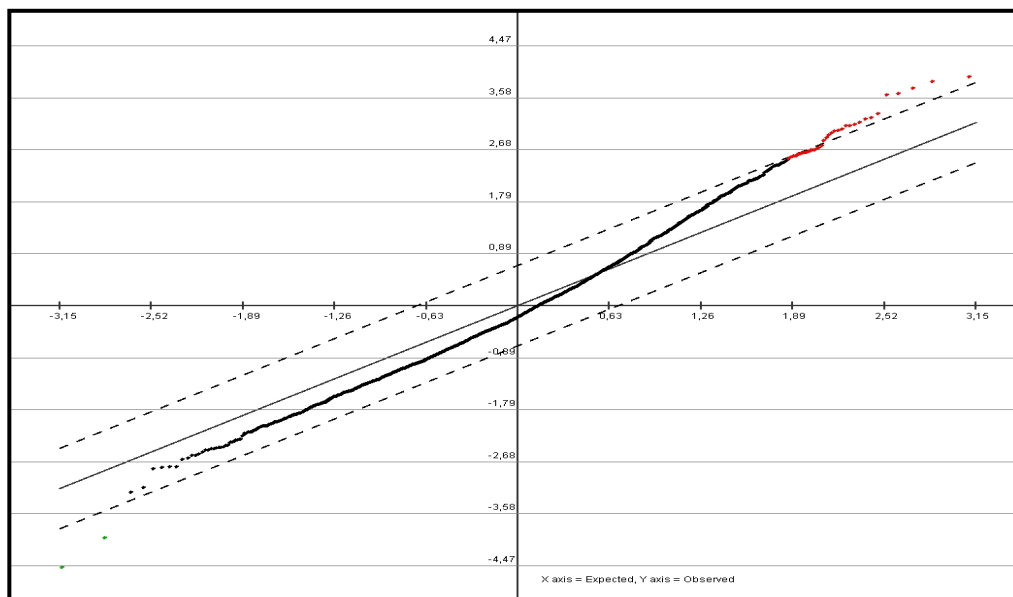
<b>Símbolo</b>	<b>Nome</b>	<b>Fold-change</b>
<b><i>ACTB</i></b>	Actin, beta	-
<b><i>ADAM17</i></b>	ADAM metallopeptidase domain 17 (tumor necrosis factor, alpha, converting enzyme)	<b>-1,38</b>
<b><i>APEX1</i></b>	APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1	<b>-1,76</b>
<b><i>APOE</i></b>	Apolipoprotein E	<b>0,51</b>
<b><i>APP</i></b>	Amyloid beta (A4) precursor protein (peptidase nexin-II, Alzheimer disease)	<b>-1,84</b>
<b><i>ATM</i></b>	Ataxia telangiectasia mutated	<b>-5,94</b>
<b><i>ATR</i></b>	Ataxia telangiectasia and Rad3 related	<b>-3,64</b>
<b><i>BACE1</i></b>	Beta-site APP-cleaving enzyme 1	<b>-3,76</b>
<b><i>DUSP1</i></b>	Dual specificity phosphatase 1	<b>-0,05</b>
<b><i>ERCC1</i></b>	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1 (includes overlapping antisense sequence)	<b>-0,97</b>
<b><i>ERCC3</i></b>	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 3 (xeroderma pigmentosum group B complementing)	<b>-1,30</b>
<b><i>ERCC6</i></b>	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 6	<b>-3,73</b>
<b><i>FANCG</i></b>	Fanconi anemia, complementation group G	<b>-3,15</b>
<b><i>FEN1</i></b>	Flap structure-specific endonuclease 1	<b>-1,22</b>
<b><i>HUS1</i></b>	HUS1 checkpoint homolog (S. pombe)	<b>-1,48</b>
<b><i>OGG1</i></b>	8-oxoguanine DNA glycosylase	<b>-0,95</b>
<b><i>PRKDC</i></b>	Protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide	<b>-1,84</b>
<b><i>RAD1</i></b>	RAD1 homolog (S. pombe)	<b>-0,63</b>
<b><i>RAD17</i></b>	RAD17 homolog (S. pombe)	<b>-1,84</b>
<b><i>RAD9</i></b>	Data not found	<b>-0,95</b>
<b><i>TREX1</i></b>	Three prime repair exonuclease 1	<b>-1,86</b>

variação observada (expressas em *fold-change*) foi de 1,12 a 1,57 para os genes induzidos e de -1,26 a -1,38 para os reprimidos.

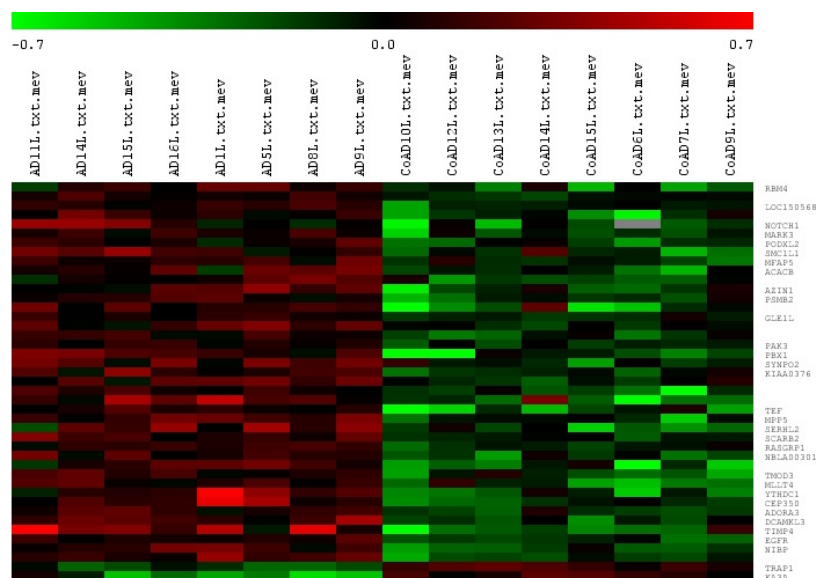
Entretanto, a distribuição dos centróides (conforme calculados a partir dos dados analisados, que representam os valores médios de expressão juntamente com os valores respectivos de desvio-padrão), variou pouco, o que aponta para uma modulação consistente, embora baixa (figura 8).

Paralelamente, foi também processada uma análise de agrupamento hierárquico dos genes, sendo utilizados os valores normalizados, obtidos de cada duplicata experimental, para aumentar o refinamento do agrupamento gênico. Para tanto, foram selecionados 187 genes a partir dos dados analisados pelo SAM (com  $FDR \leq 0,176$ ).

Os resultados fornecidos pelo agrupamento hierárquico mostraram cinco grupos de genes, sendo que cada um mostra um perfil de expressão característico (figura 9). Destes, 4 agrupamentos apresentaram genes predominantemente induzidos, enquanto que apenas um mostrou um padrão de repressão, comprando-se os pacientes DA com os controles.



**Figura 6:** Genes diferencialmente expressos avaliados pelo programa SAM. Resultados das comparações entre a distância relativa observada  $d(i)$  e esperada  $dE(i)$  dos dados referentes à relação amostras vs *pool* de órgãos. A linha cheia é a região onde  $d(i) = dE(i)$  e as linhas tracejadas são cortes a uma distância  $\Delta$  da linha cheia. Os pontos abaixo (2) à linha tracejada inferior representam os genes reprimidos, enquanto que os pontos acima da linha tracejada superior (41), os induzidos ( $FDR \leq 0,061$ ).



**Figura 7:** Agrupamento dos genes significativamente modulados, selecionados pelo método SAM ( $FDR = 0,061$ ), em pacientes com Alzheimer vs controle. Os valores de expressão para cada gene estão representados de acordo com a escala apresentada no topo (Paciente,  $n = 8$ ; Controle,  $n = 8$ )

**Tabela 4:** Lista de genes que apresentaram uma modulação significativa na comparação entre pacientes Alzheimer e indivíduos controles. A análise estatística foi realizada pelo SAM, com um FDR  $\leq 0,061$ :

CloneID	Símbolo	Nome do gene	Localização cromossômica	Função	FC	q-value
132159	PSMB2	Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 2	1p34.2	Proteassoma	1,199	6,015
27806	PBX1	Pre-B-cell leukemia homeobox 1	1q23	Ativador transcricional / Desenvolvimento e diferenciação sexual / Desenvolvimento embrionário	1,444	6,015
132418	CEP350	Centrosomal protein 350kDa	1p36.13-q41	Estrutura celular	1,444	6,015
137746	ADORA3	Adenosine A3 receptor	1p13.2	Receptor de membrana / Ligação com proteína G	1,209	0,000
141446	RBM4	RNA binding motif protein 4	11q13	Processamento do RNA	1,237	5,595
138496	MFAP5	Microfibrillar associated protein 5	12p13.1-p12.3	Estrutura celular	1,174	6,015
155842	ACACB	Acetyl-Coenzyme A carboxylase beta	12q24.11	Síntese e oxidação de ácidos graxos / Atividade ligase	1,237	6,015
45556	MARK3	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3	14q32.3	Atividade cinase / Atividade transferase	1,199	6,015
135670	MPP5	Membrane protein, palmitoylated 5 (MAGUK p55 subfamily member 5)	14q23.3	Receptor de membrana / Supressão tumoral / Transdução de sinal	1,253	4,456
25016	RASGRP1	RAS guanyl releasing protein 1 (calcium and DAG-regulated)	15q15	Transdução de sinal via RAS / Adesão a íons de Cálcio	1,166	4,718
39800	TMOD3	Tropomodulin 3 (ubiquitous)	15q21.1-q21.2	Estrutura celular	1,254	0,000
143480	TRAP1	TNF receptor-associated protein 1	16p13.3	Dobramento de proteínas / Receptor de fator de necrose de tumor	-1,264	0,000
139713	KA35	Transcribed locus, weakly similar to NP_002270.1   hair keratin 3B [Homo sapiens]	17q21.2		-1,376	0,000
27807	LOC150568	Hypothetical protein LOC150568	2q12.1		1,161	5,868
32472	KIAA0376	SPECC1-like	22q11.23	Transporte de proteína	1,202	6,015

Continuação

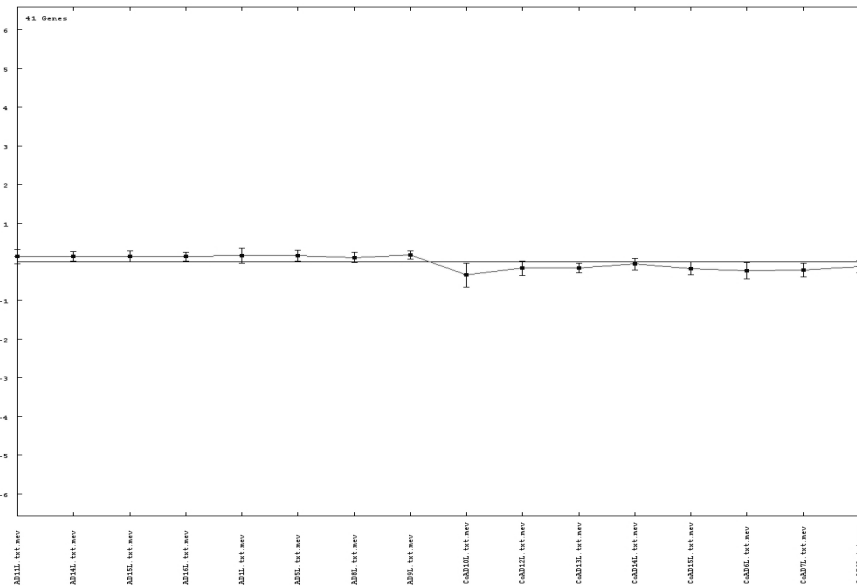
CloneID	Símbolo	Nome do gene	Localização cromossômica	Função	FC	q-value
22983	TEF	Thyrotrophic embryonic factor	22q13 22q13.2	Fator de transcrição / Desenvolvimento da glândula pituitária	1,297	4,221
138090	SERHL2	Serine hydrolase-like 2	22q13	Atividade hidrolase / Metabolismo	1,340	4,718
27741	PODXL2	Transcribed locus, moderately similar to XP_001099370.1 similar to endoglycan [Macaca mulatta]	3q21.3		1,192	6,015
35092	DCAMKL3	Doublecortin-like kinase 3	3p22.2	Sinalização celular / Desenvolvimento neuronal	1,278	0,000
28045	TIMP4		3p25	Metabolismo / Oxidação de componentes	1,572	0,000
135766		Hypothetical protein LOC285500	4q34.3	Metabolismo	1,185	6,015
137663	SYNPO2		4q26		1,233	6,015
141975	SCARB2	Scavenger receptor class B, member 2	4q21.1	Transporte de membrana / Adesão celular	1,188	4,718
131656	NBLA00301	Putative protein product of Nbla00301	4q34.1		1,235	0,000
135853	YTHDC1		4q13.2		1,374	0,000
35380					1,354	6,015
131668		Full length insert cDNA YI09H09			1,216	6,015
23872		CDNA: FLJ22515 fis, clone HRC12122, highly similar to AF052101 Homo sapiens clone 23872 mRNA sequence		Metabolismo	1,242	3,819
141797	MLLT4	Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 4	6q27	Estrutura celular / Transdução de sinal / Atividade motora	1,279	0,000
38931					1,200	6,015

Continuação

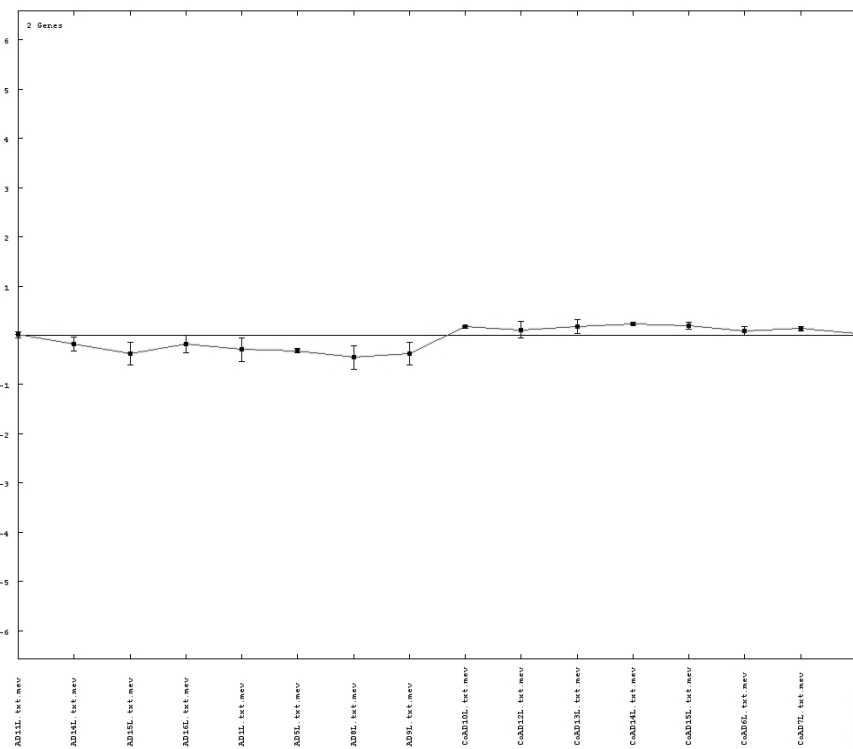
CloneID	Símbolo	Nome do gene	Localização cromossômica	Função	FC	q-value
135324	EGFR	Epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog, avian)	7p12	Proliferação e diferenciação celular	1,207	0,000
138210	AZIN1	Antizyme inhibitor 1	8q22.3	Atividade catalítica	1,262	6,015
132136	NIBP	NIK and IKK{beta} binding protein	8q24.3		1,291	0,000
51275	NOTCH1	Notch homolog 1, translocation-associated (Drosophila)	9q34.3	Fator de crescimento / Diferenciação celular / Transdução de sinal	1,306	6,015
31740	GLE1L	GLE1 RNA export mediator-like (yeast)	9q34.11	Transporte de RNA	1,123	6,015
31914	SMC1A	Structural maintenance of chromosomes 1A	Xp11.22-p11.21	Coesão de cromátides irmãs / Reparo de DNA / <i>Checkpoint</i> do ciclo celular / Resposta a danos no DNA	1,249	6,015
132217	PAK3	P21 (CDKN1A)-activated kinase 3	Xq22.3-q23	Transdução de sinal / Desenvolvimento dendrítico e plasticidade sináptica	1,139	6,015



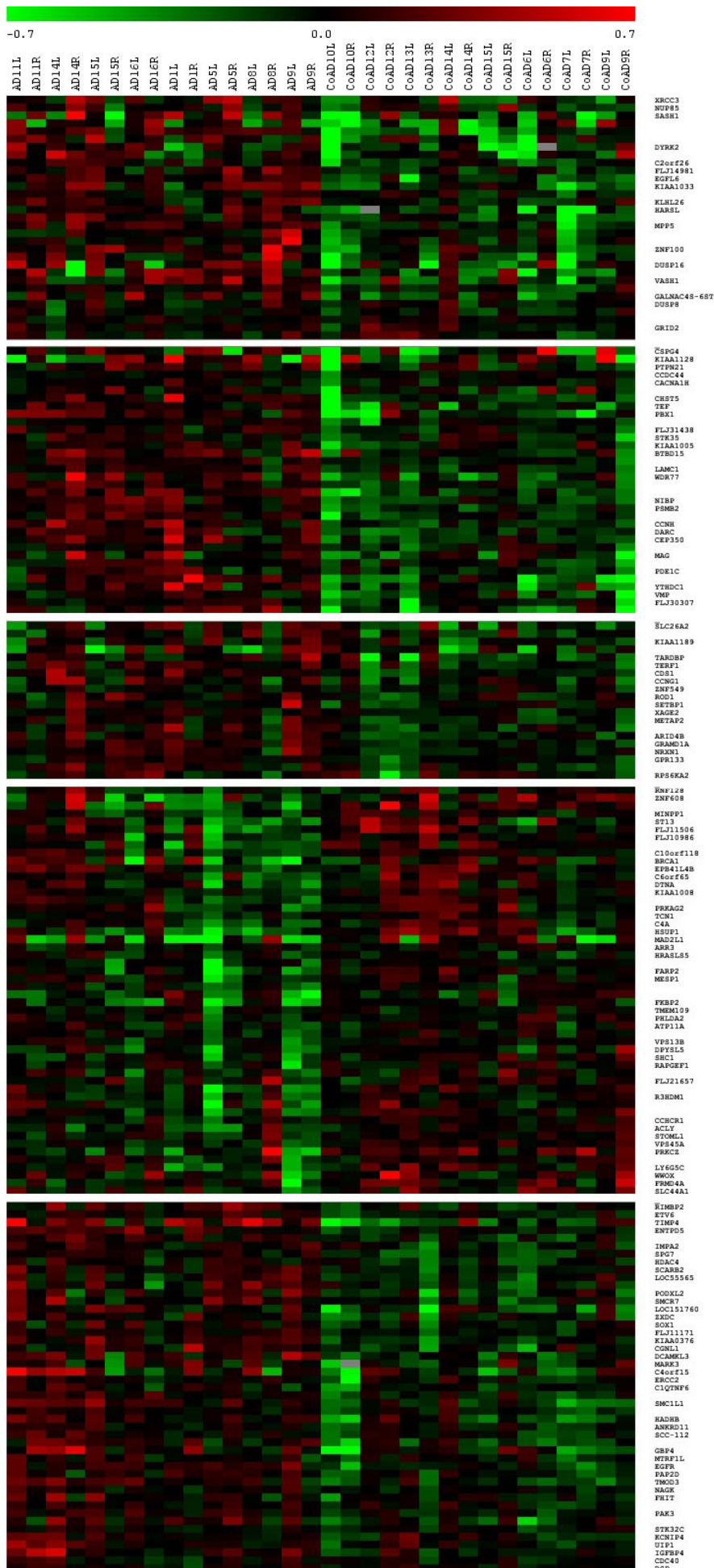
A



B



**Figura 8:** Centr3ides obtidos para os 43 genes, induzidos (A) e reprimidos (B), encontrados significativamente modulados em pacientes com Alzheimer. Apesar de n3o apresentarem grandes varia33es no *fold-change*, os baixos desvios dos centr3ides indicam uma certa homogeneidade entre as amostras.



**Figura 9:** Agrupamento hierárquico de 187 genes, previamente selecionados pelo método SAM (FDR= 0,176), em pacientes com Alzheimer vs controle. Os valores de expressão para cada gene estão representados de acordo com a escala apresentada no topo, sendo que a cor vermelha indica indução e a cor verde, repressão. A cor cinza indica pontos perdidos. (Paciente, n= 8; Controle, n= 8)

## DISCUSSÃO

### *Dano oxidativo e genes envolvidos na condição DA*

Nos últimos tempos, muitas observações têm levantado questões a respeito da aparente simplicidade da via BER, particularmente no reparo *in vivo* do dano oxidativo no DNA. Cooper, Gowen e colegas demonstraram, por exemplo, que o reparo da timina-glicol (Tg) no DNA de células tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ocorre preferencialmente em regiões transcricionalmente ativas e particularmente na fita transcrita do DNA (Cooper *et al.*, 1997; Gowen *et al.*, 1998).

Recentemente, Cooper e colaboradores mostraram que muitas proteínas do NER também estão envolvidas no reparo da Tg *in vivo*, embora algumas de suas atividades sejam redundantes. Isso apóia a idéia que o TCR de bases oxidadas não funciona via NER e BER parece ser via preferencial (Cooper *et al.*, 1997). Dados sobre a modulação dos genes envolvidos nessa via de reparo foram avaliados neste trabalho e os resultados são discutidos mais adiante.

Gowen e colegas mostraram ainda que BRCA1 e a sua proteína associada BAP1, as quais têm um papel importante na supressão do câncer de mama, também estão envolvidas no TCR da timina glicol (Gowen *et al.*, 1998).

Entretanto, isso poderia ser explicado pela possibilidade de que uma variedade grande de proteínas acessórias seja necessária para o reparo *in vivo* dos danos no DNA induzidos por ROS, as quais devem estar envolvidas em várias etapas, desde o reconhecimento da lesão até a coordenação do processo(s) de reparo(s) competente(s).

Sabe-se atualmente que existem genes com uma estrita relação, de alguma forma, com a patogênese da doença de Alzheimer. Como é o caso do gene codificador da proteína precursora de amiloide (*amyloid precursor protein* – APP), onde mutações sem sentido já foram descritas (Campion *et al.*, 1999) e os genes da presenilina 1 (PS1) e 2 (PS2). Entretanto, boa parte dessa relação parte de estudos com casos de Alzheimer familiar, os quais correspondem à cerca de 5-10% dos casos diagnosticados atualmente. Por isso, devido a padrões muito complexos de herança nos casos de Alzheimer esporádico, poucas informações a respeito dessas associações gene-patogênese estão disponíveis, sendo que o gene da apolipoproteína E (APOE) é o único consistentemente associado à doença (Baum *et al.*, 2000).

Todavia, seria ilógico supor que existam genes exclusivamente relacionados ao desenvolvimento da doença, uma vez que a DA parece resultar do envelhecimento e que este, por si só, já traduz uma questão enigmática para toda a ciência, há séculos. Embora um

considerável volume de informações já tenha sido relatado a respeito, dentre elas o declínio nas atividades metabólicas celulares, incluindo-se o acúmulo de danos oxidativos, seja por produção aumentada ROS, ou pelo funcionamento deficiente dos sistemas antioxidantes.

O presente trabalho sobre a doença de Alzheimer teve como enfoque o estudo dos fatores diretamente relacionados à doença, além de alguns outros que possam influenciá-la, como a geração de danos oxidativos, detecção ou percepção desses danos, maquinarias atuantes de reparo e num aspecto mais geral, uma assinatura genética peculiar apresentada pelos pacientes portadores de Alzheimer.

Os dados obtidos no teste do Cometa e das reações de qRT-PCR em tempo real indicaram que, de fato, os pacientes DA apresentaram características diferentes das apresentadas pelos indivíduos normais não DA.

Entre os genes relacionados mais diretamente à DA, envolvidos na produção ou deposição das placas amilóide  $\beta$ , observou-se uma distinta variação em seus padrões de expressão quando comparados com os controles, especificamente *ADAM17*, *APOE*, *APP* e *BACE1*, discutidos a seguir.

Observamos que, com a exceção da indução de *APOE* ( $FC= 0,51$ ), os genes *ADAM17* ( $-1,38$ ), *APP* ( $-1,84$ ) e *BACE1* ( $-3,76$ ), mostraram-se reprimidos em relação ao controle.

Uma vez relatado que o alelo  $\epsilon 4$  da apolipoproteína E (apoE) é induzido nos pacientes DA (Strittmatter *et al.*, 1993), muitos estudos posteriores tentaram examinar a possível relação entre os alelos de apoE e a patologia de DA (Beffert & Poirier, 1996; Beffert & Poirier, 1998). Muitos deles demonstraram um aumento de amilóide  $\beta$  em cérebros de pacientes DA que herdavam, pelo menos, um alelo apoE4 em comparação aos pacientes sem esse, embora esta seja uma associação fraca e não encontrada em todas as áreas do cérebro e nem em todos os estudos (Beffert & Poirier, 1996; Gearing *et al.*, 1996; Beffert & Poirier, 1998). Tais estudos sobre os efeitos das isoformas de apoE na agregação da A $\beta$  em culturas de neurônios e camundongos transgênicos auxiliaram na elucidação das funções das isoformas de apoE na patogênese de Alzheimer.

Os pacientes DA com pelo menos um alelo  $\epsilon 4$  tendem a apresentar uma maior deposição de amilóide do que os pacientes sem esse alelo (Beffert & Poirier, 1996; Beffert & Poirier, 1998). Tanto o hipocampo, como o córtex, demonstraram essa tendência. Os depósitos amilóides cerebrovascular também são aumentados em pacientes com  $\epsilon 4$  (Berg *et al.*, 1998). Já o alelo  $\epsilon 2$  parece ter um efeito contrário, com menos deposição de amilóides (Lippa *et al.*, 1997).

Interessante é notar também que a apoE4 é mais comum não só entre os pacientes DA, mas também está associada a outras complicações neurológicas graves e pacientes infartados (Nicoll *et al.*, 1997), bem como a deterioração mais rápida em esclerose múltipla (Chapman *et al.*, 1999). Essas evidências sugerem que, com relação à apoE3 e apoE2, a apoE4 prejudica o funcionamento neuronal ou a recuperação cerebral em resposta às lesões.

Todavia, os dados obtidos no presente trabalho apontam para uma indução no nível transcricional de apoE. Podemos especular que o *primer* empregado tenha amplificado a isoforma  $\epsilon 4$ , ou que ela esteja em maior proporção nos pacientes DA. Em reforço à primeira hipótese, foi demonstrada uma incidência maior de  $\epsilon 4$  juntamente com a presença de certos SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*) do gene *BDNF* (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*), também associado à doença (Huang *et al.*, 2007). Entretanto, estudos anteriores mostraram que os níveis de apoE em camundongos expressando apoE3 e apoE4 não foram significativamente diferentes no córtex ou no fluido cerebrospinal (FCE), indicando que diferenças no nível de apoE não são responsáveis pelas diferenças patológicas observadas entre camundongos com *APOE3* e *APOE4* induzidos.

Ainda, pode ocorrer que, embora os níveis transcricionais desses genes tenham apresentado uma modulação positiva (ativação) com relação aos controles, alterações em nível traducional também podem ter ocorrido; por exemplo, alguma via que preferencialmente produza a isoforma  $\epsilon 4$  e favoreça o seu dobramento e/ou um *splicing* alternativo. Entretanto, não existe qualquer informação a esse respeito na literatura, o que aponta para novas perspectivas nessa direção.

A deposição de A $\beta$  ocorre em formas oligoméricas, profibrilares, amiloesferóides e fibrilares (Kuo *et al.*, 1996; Lambert *et al.*, 1998; Walsh *et al.*, 2002). A relação de causa e efeito entre a deposição de A $\beta$  e o desenvolvimento de DA tem sido fortemente apoiada em mutações gênicas associadas a Alzheimer familiar, as quais são responsáveis pela produção elevada de A $\beta$ 42. A amilóide  $\beta$ 42 apresenta um potencial maior de agregação comparada à A $\beta$ 40, sendo que atua como agente patológico primário. Vale salientar que a A $\beta$  é um peptídeo, logo é constantemente metabolizada no cérebro (Seubert *et al.*, 1993). Assim, o estado normal dos níveis dessa proteína é determinado pelo balanço metabólico entre as atividades anabólicas e catabólicas (Selkoe, 2001). Mesmo alterações sutis nesse balanço por um longo período, poderiam resultar no surgimento das formas patogênicas da A $\beta$ , influenciando o progresso patológico e a incidência da doença. Por exemplo, um aumento da ordem de 1,5 na

produção da amiloide  $\beta$ , causada pela maioria das mutações supracitadas, resulta em envelhecimento precoce agressivo (Sherrington *et al.*, 1995).

Sendo assim, é de se esperar que a APP desempenhe um papel central na patogênese de DA, pois está envolvida no processo coordenado – mediado pela  $\beta$ -secretase (BACE) e  $\gamma$ -secretase – que leva à formação da amiloide  $\beta$ . Alternativamente, a APP pode ser levada à uma via não-amiloidogênica, executada por uma  $\alpha$ -secretase, como a ADAM 10 (2) ou ADAM17 (Buxbaum *et al.*, 1998; Tyler *et al.*, 2002).

Em cérebros de pacientes DA a clivagem de APP acontece graças a proteases – denominadas  $\beta$ - e  $\gamma$ -secretases, em ambos os lados da seqüência de A $\beta$  da molécula de APP – e resulta na síntese do peptídeo da amiloide  $\beta$  (Haass *et al.*, 1992; Shoji *et al.*, 1992).

Alguns estudos sugerem que a atividade da  $\beta$ -secretase (BACE) aumenta em casos de Alzheimer esporádicos (Fukumoto *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2004). Neles foram encontrados, tanto níveis de transcrição do mRNA, quanto a expressão de proteínas, aumentadas no córtex frontal *in vivo* de pacientes e viram que esses níveis não correspondiam a quaisquer mutações no gene *BACE*. Essas observações demonstraram uma correlação positiva entre os depósitos de A $\beta$  e o aumento da atividade de BACE em pacientes DA esporádicos. A elevação de BACE deve levar a um aumento na produção de A $\beta$  e deve aumentar, por consequência, a deposição das placas A $\beta$  (Li *et al.*, 2004).

Entretanto, os nossos resultados apontam o contrário, onde *APP* e *BACE1* dos pacientes DA apresentaram um perfil de expressão reprimido relativo ao controle (FC = -1,84 e -3,76, respectivamente). Tais dados obtidos, assim como os demais aqui discutidos, podem ser também devido ao tipo celular estudado (linfócitos). Pacientes de Alzheimer esporádico demonstraram uma alteração na expressão de APP em plaquetas, quando comparadas com controle pareados e pacientes com demência não-DA (Di Luca *et al.*, 1998). Di Luca e colaboradores observaram que paciente DA apresentaram uma alteração específica nos níveis das isoformas de APP, particularmente, um declínio na razão entre as isoformas maiores, de 130kd, e menores, entre 106-110, quando comparada à do grupo controle e até mesmo a outros grupos com doenças neurodegenerativas associadas à demência (Di Luca *et al.*, 1998). Apesar disso, os autores encontraram níveis semelhantes de mRNA de um dos três principais transcritos de APP entre os grupos analisados. Os dados obtidos no presente trabalho mostram, porém, dados conflitantes com os da literatura. Pode-se sugerir que o mRNA da APP amplificado refere-se a uma das outras duas formas.

Colciaghi e colaboradores realizaram estudos similares para a proteína BACE e encontraram duas formas específicas dessa enzima, uma de 36 kDa e outra de 57 kDa. Observaram também um declínio acentuado da primeira forma em pacientes Alzheimer, quando comparado ao grupo controle, sendo que essa atenuação havia sido perceptível mesmo em pacientes DA grau leve; por outro lado, o decréscimo da forma 36 kDa de BACE provavelmente pode estar relacionado à uma atividade aumentada dessa enzima, inerente às suas características morfológicas (Colciaghi *et al.*, 2004). Enquanto a forma 57 kDa de BACE deve representar a estrutura inteira de BACE, os autores sugeriram que a 36 kDa deve estar associada a um complexo estável dos fragmentos N- e C-terminais, pela endoproteólise da própria BACE. Embora não se saiba o papel específico da endoproteólise de BACE, esse processo parece ser um evento fisiológico atenuador da  $\beta$ -secretase (Huse *et al.*, 2003). A redução da atividade de BACE também foi verificada em tecidos *postmortem* (Holsinger *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2003). É possível que uma alteração na atuação conjunta entre os componentes da cascata amilóide ocorra em DA, concomitantemente ao decréscimo da atividade da  $\alpha$ -secretase e aumento da atividade da  $\beta$ -secretase (Colciaghi *et al.*, 2004).

O fato de camundongos deficientes para as proteases  $\beta$ - e  $\gamma$ -secretases não produzirem o peptídeo A $\beta$ , implica, claramente, que o complexo BACE1 e a  $\gamma$ -secretase é a protease amiloidogênica *in vivo* e, por isso, essas proteínas constituem um alvo interessante em medidas terapêuticas para pacientes DA (Haass, 2004).

Outros estudos também relataram uma expressão atenuada de ADAM10 em pacientes DA moderados e graves, implicando na baixa atividade dessa enzima (Colciaghi *et al.*, 2004). Similarmente, verificou-se uma repressão transcricional de *ADAM17* (FC= -1,38) em linfócitos de pacientes Alzheimer, comparados aos controles. No entanto, considerando a sua função biológica no sistema amiloidogênico, a sua repressão parece razoável – o produto gênico de *ADAM17*, a exemplo do *ADAM10*, também é responsável pela clivagem não-amiloidogênica de APP.

A via antiamiloidogênica começa com a APP sendo clivada pela  $\alpha$ -secretase, a qual corta o domínio A $\beta$ , evitando assim, a geração do peptídeo. Depois da  $\alpha$ -secretase, o fragmento da região C-terminal da APP sofre a  $\gamma$ -clivagem, levando à geração do peptídeo p3 (Padovani *et al.*, 2001), que parece ser benigno, uma vez que ele não é encontrado nas placas A $\beta$  características de DA (Lichtenthaler & Haass, 2004). A  $\alpha$ -secretase é um membro da família ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase) de proteases (Allinson *et al.*, 2003) e tanto

ADAM10 (Lammich *et al.*, 1999), quanto ADAM17/TACE (Buxbaum *et al.*, 1998), parecem ser responsáveis pela  $\alpha$ -clivagem (Lichtenthaler & Haass, 2004).

Ainda, em concordância com os dados obtidos no presente trabalho, a expressão de TACE também foi investigada em células neuronais e não-neuronais por *Western blotting* (Skovronsky *et al.*, 2001). Nesse estudo, TACE mostrou-se presente nas células nervosas e foi sutilmente detectada em células gliais. Além disso, a localização imunohistoquímica apresentou expressão de TACE em populações neuronais distintas, particularmente naquelas afetadas em DA. Níveis muito baixos de TACE foram observados no cerebelo. Essas observações, portanto, permitem sugerir que a repressão de *ADAM17* (FC= -1,38) verificada neste trabalho não deve ser apenas relacionada à atividade da sua enzima, mas também à sua localização.

Uma vez que a ação combinada da  $\beta$ - e  $\gamma$ -secretase leva à formação do peptídeo A $\beta$ , a inibição de suas atividades parece ser bastante promissora no tratamento e prevenção de Alzheimer (Lichtenthaler & Haass, 2004). Todavia, o desenvolvimento de inibidores específicos para essas enzimas, os quais são capazes de ultrapassar a barreira hematoencefálica (*Blood-Brain Barrier* – BBB) parece ser desafiador. A BACE1 parece ter uma elevada atividade de clivagem, o que torna difícil a síntese de inibidores específicos (Hong *et al.*, 2000). A aplicabilidade da inibição da  $\beta$ -secretase tem sido questionada por existirem evidências de que essa protease está envolvida nos mecanismos fisiológicos de sinalização muito importantes, necessários na decisão do destino celular (Hammond *et al.*, 2003; Shiloh, 2003). Embora esses problemas possam ser contornados, a procura por alvos alternativos parece ser mais apropriada (Lichtenthaler & Haass, 2004).

Uma das abordagens pode ser a facilitação da clivagem de APP pela  $\alpha$ -secretase, uma idéia baseada em achados originais de Nitsch e colegas (Nitsch *et al.*, 1992). Sendo que a  $\alpha$ -secretase cliva o domínio A $\beta$ , a sua ativação pode apresentar uma vantagem dupla de não apenas evitar a formação do peptídeo A $\beta$  neurotóxico, mas também de formar o peptídeo sAPP $\alpha$  neuroprotetor (Klungland *et al.*, 1999; Minowa *et al.*, 2000). Essa abordagem tem recebido pouca atenção, embora seja tentadora, uma vez que BACE1 e  $\alpha$ -secretase competem pelo ectodomínio de APP (Arai *et al.*, 2003). Apesar de ser um aspecto interessante, permanece a ser elucidado se a atividade das proteases ADAM em excesso podem tornar-se amiloidogênicas *in vivo*.

De acordo com os resultados obtidos e pelas informações obtidas a partir da literatura, a inibição de *ADAM17*, *APP* e *BACE1* (embora esta esteja associada à produção e acúmulo de  $\beta$ -amilóide) e a indução de *APOE*, provavelmente devam contribuir para a progressão da DA.



Não obstante, embora não abordada no presente trabalho, existe ainda a via catabólica da proteína amiloide  $\beta$ , a qual é a responsável pela degradação dessa proteína.

A redução da atividade catabólica da  $A\beta$  envolvendo enzimas da sua degradação também tem sido uma causa provável do acúmulo da deposição de  $A\beta$ . Tanto a indução da atividade catabólica, como a inibição da anabólica deveria prevenir ou reduzir a deposição de  $A\beta$  e assim, serem aplicáveis para a prevenção e terapia anti-Alzheimer (Iwata *et al.*, 2005).

Muitas peptidases já foram propostas como degradantes da  $A\beta$ : gelatinase A (Yamada *et al.*, 1995), gelatinase B (Backstrom *et al.*, 1996), neprililina (Howell *et al.*, 1995), enzima degradante de insulina (IDE) (Kurochkin & Goto, 1994), catepsina D (Hamazaki, 1996), metaloendopeptidase (Carvalho *et al.*, 1997), fator de coagulação XIa (Saporito-Irwin & Van Nostrand, 1995), plasmina (Van Nostrand & Porter, 1999), proteína conversora de endotelina 1 (ECE1) (Eckman *et al.*, 2001) e enzima conversora de angiotensina (ACE) (Hu *et al.*, 2001).

Foi observado que a atividade de degradação da  $A\beta$  acontece predominantemente via neprililina (Takaki *et al.*, 2000). Iwata e pesquisadores, utilizando camundongos nocauteados para a neprililina, propuseram que a deficiência desta poderia influenciar o estado normal dos níveis de  $A\beta$  no cérebro, alterando o seu metabolismo.

Uma vez que a neprililina parece ser a maior responsável pela degradação da  $A\beta$ , como descrito acima, é bem provável que esteja associada com a patologia em cérebro de pacientes DA. Não obstante, a relevância patológica da neprililina na doença de Alzheimer ainda requer um maior número de evidências e investigação, tais como avaliação da sua localização precisa no cérebro, a relação com os fatores de risco da doença e mudanças na expressão do cérebro de pacientes (Iwata *et al.*, 2001; Iwata *et al.*, 2005).

#### *Possível comprometimento das maquinarias de percepção do dano e reparo de DNA em linfócitos de pacientes DA*

Como citado anteriormente, seria pouco provável que existissem genes relacionados exclusivamente à patogênese de Alzheimer, portanto é importante ressaltar que a doença está intimamente relacionada à idade, com risco de aumento de incidência a cada ano e, por isso, seria importante avaliações sob outros pontos de vista, as outras possíveis causas possíveis no desenvolvimento da doença, como a manutenção das atividades de percepção e reparo dos danos causados por agentes oxidativos.

As ROS são formadas principalmente nas mitocôndrias durante a respiração celular. Esses produtos podem atacar todos os constituintes celulares, incluindo lipídeos, proteínas e

ácido nucléico. A teoria dos radicais livres/estresse oxidativo no envelhecimento, como visto anteriormente, propõe que o acúmulo de danos oxidativos durante a vida de um organismo leva a um declínio gradual nos sistemas de manutenção da célula e, eventualmente, à morte (Wilson & Bohr, 2007).

Foi sugerido que deficiências, ou uma diminuição, na atividade de reparo de dano oxidativo correlaciona-se com o envelhecimento prematuro e/ou às doenças em decorrência da idade. Na verdade, resultados apoiando a idéia de que os sistemas de manutenção do genoma constituem um fator determinante da longevidade e viabilidade celular, se originam de estudos em organismos-modelos e síndromes humanas progeróides, como as de Werner e Cockayne (Wilson & Bohr, 2007). Muitos modelos de ratos deficientes na manutenção do genoma estão disponíveis hoje e, assim como no homem, apresentam sintomas de envelhecimento acelerado (Hasty *et al.*, 2003; Lombard *et al.*, 2005). Dentre os existentes, há os ratos com tricotodistrofia (TTD) (de Boer *et al.*, 2002). Esses animais deficientes em NER exibem propriedades associadas à idade avançada, por exemplo, osteoporose, osteosclerose, infertilidade e longevidade reduzida.

Outros exemplos de modelos com sintomas de envelhecimento precoce incluem aqueles ineficientes no reparo de DSBs (ATM e Ku80), NER (ERCC1, XPF e XPA/CSB), manutenção da telomerase e replicação do genoma mitocondrial (Lombard *et al.*, 2005).

Evidências consideráveis indicam que falhas nas respostas ao dano no DNA estão ligadas diretamente à neurodegeneração; esse aspecto tem sido melhor elucidado no caso de doenças humanas resultantes de mutações em um dos seguintes genes: *ATM*, *NBS1*, genes *XP*, da síndrome de Cockayne (*CS*) e Werner (*WS*), *BLM* ou *FA* (Rolig & McKinnon, 2000). Pacientes com tais desordens exibem ataxia, neurodegeneração progressiva e retardo mental.

Vários estudos relatam o papel do dano oxidativo na neurodegeneração, sendo sugerido que a deficiência na via BER poderia estar associada à uma má função neuronal. Como os neurônios não se dividem, parece razoável prever que o acúmulo de danos endógenos no DNA poderia prejudicar processos celulares essenciais, como a transcrição geral e promoção de morte celular (Nospikel & Hanawalt, 2002). Consistentemente, deficiência na DNA glicosilase UNG, na DNA glicosilase alquiladenina (AGG), ou APE1, levam à susceptibilidade das células neuronais à apoptose espontânea (Kruman *et al.*, 2004). Entretanto, um estudo recente indica que a apoptose em neurônios induzida por dano oxidativo está correlacionada com o desequilíbrio de BER nas mitocôndrias (Harrison *et al.*, 2005), mas essa questão sobre a perda neuronal por apoptose é ainda pouco elucidada.

De acordo com os dados obtidos no presente trabalho, os pacientes DA apresentaram uma redução nos níveis transcricionais dos genes envolvidos em BER, sendo eles *APEX1* (FC = -1,76), *OGG1* (FC = -0,95), *FEN1* (FC = -1,22).

Se por um lado sabe-se que APE1 participa dos processos iniciais de BER, por outro, torna-se difícil saber qual o verdadeiro papel que essa proteína desempenha, pelo fato de não ter sido estabelecida ainda uma cultura de células humanas deficientes para tal gene. Foi sugerido que deve haver funções adicionais de APE1 não relacionadas ao processo de reparo (Evans *et al.*, 2000). Dentre elas, a atividade Ref-1, na qual a APE1 pode atuar como um agente redutor para as formas oxidadas de alguns fatores de transcrição, restabelecendo a atividade de ligação ao DNA (Xanthoudakis *et al.*, 1992; Walker *et al.*, 1993). Outras funções propostas incluem a sua atuação como um co-repressor transcricional de alguns genes ou à sua atividade redutora celular para alguns componentes xenobióticos (Okazaki *et al.*, 1994; Evans *et al.*, 2000). Sendo assim, parece possível que uma ou mais dessas funções contribuam para o papel essencial de Ape1 em células de mamíferos, o que contrasta com a aparente dispensabilidade das endonucleases AP microbianas.

Como já discutido, algumas questões sobre o papel biológico da Ape1 surgiram a partir de diversas direções: a letalidade embrionária em camundongos *Ape1* nocauteados e a aparente inviabilidade desses; a contrastante viabilidade de *E. coli* e *S. cerevisiae*; e as atividades múltiplas não relacionadas ao reparo (Evans *et al.*, 2000). Demple e Sung observaram que uma supressão substancial de Ape1 (menos de 30% do total normal) exerceu um efeito dramático em cada caso: inibição da proliferação celular e ativação de marcadores apoptóticos (Demple & Sung, 2005). Em um outro experimento, os autores foram capazes de demonstrar que a supressão de Ape1 aumentou o nível de danos endógenos abásicos no DNA, por cerca de dez vezes com relação às células controles. O resultado indica que a Ape1 é necessária para lidar com a formação desses sítios, os quais poderiam acumular níveis suficientes para causar apoptose.

O acúmulo de danos abásicos a partir de fontes endógenas pode ser letal em células humanas deficientes para Ape1, mas evidentemente não em microorganismos, os quais podem sobreviver mesmo na ausência de 95% de sua atividade de endonuclease AP (Demple & Harrison, 1994). Muitas explicações parecem possíveis para essa diferença: as quantidades muito menores de DNA em leveduras (12,5 Mb) ou em *E. coli* (4,6 Mb), comparadas à de humanos (2 x 2900 Mb), podem significar que muito menos lesões por célula são geradas em microorganismos; vias de reparo alternativas, como a recombinação em leveduras, podem ser

suficientes para compensar a ausência da endonuclease AP quando a célula não é lesionada (Demple & Harrison, 1994).

Uma vez que também foi encontrada uma modulação diferencial do gene *OGG1*, seria de fundamental importância o estabelecimento de uma relação entre a atividade do seu produto gênico e o acúmulo do dano oxidativo, o que levaria, a longo prazo, o desenvolvimento da patogênese de DA.

A 8-oxoG é altamente mutagênica, pois a adenina é preferencialmente incorporada à base oxidada durante a replicação pelas DNA polimerases, produzindo transversões GC para TA. Para prevenir a mutagenicidade induzida pela 8-oxoG a célula possui um mecanismo denominado de sistema GO, o qual consiste no homólogo de *MutY* (*MYH*), *OGG1* e *MutT* (Michaels & Miller, 1992; Hazra *et al.*, 2001). A proteína *MutT* é uma fosfatase que converte especificamente a 8-oxo-dGTP do *pool* de nucleotídeos em 8-oxo-dGMP, para evitar que os nucleotídeos oxidados sejam incorporados ao DNA replicante. Tanto *MYH*, quanto *OGG1* são glicosilases específicas para a 8-oxo-G e, enquanto a *OGG1* remove a 8-oxoG do DNA lesionado, *MYH* excisa os resíduos de adenina incorporados com a 8-oxoG (Mao *et al.*, 2007).

As mutações em *OGG1* e *MYH* têm sido associadas ao desenvolvimento de certas doenças humanas, incluindo câncer (Boiteux & Radicella, 2000; Parker *et al.*, 2003). Camundongos nocauteados para *OGG1* acumularam maiores níveis de lesões 8-oxoG, comparados aos controles (Klungland *et al.*, 1999; Minowa *et al.*, 2000) e exibiram maior índice de mutações espontâneas, especialmente quando expostos a maiores níveis de estresse oxidativo (Arai *et al.*, 2003). Essas observações sugerem que a *OGG1* atua como um fator principal na via de remoção da 8-oxoG (Mao *et al.*, 2007).

É interessante notar também que a atividade da enzima *OGG1* pode ter sido, de alguma forma, responsável pela frequência menor de danos observada em pacientes DA, pelo teste do Cometa. Uma causa plausível seria que, apesar de pacientes e controles terem sido submetidos aos mesmos protocolos de tratamento, a atividade da enzima *OGG1* seja mais eficiente nos indivíduos controle. E de acordo com o trabalho de Mao, onde extratos nucleares obtidos de cérebro de indivíduos DA foram analisados quanto ao reparo de 8-oxoG, os extratos celulares de todos os controle exibiram maiores níveis de atividade da *OGG1*, enquanto os extratos dos pacientes DA observados apresentaram apenas a metade da atividade glicosilase vista nos controles (Mao *et al.*, 2007).

Outra razão possível e não necessariamente excludente da anterior seria uma interação fraca entre a *OGG1* e alguma(s) proteína(s) acessórias nos pacientes DA. Embora a *OGG1* (e

as demais glicosilases) não seja essencial para o reparo do dano, muitos estudos têm registrado interações complexas de proteínas “auxiliares” (fatores não-essenciais *in vitro*). Muitas dessas proteínas ou suas interações específicas parecem ter uma função na coordenação precisa das etapas de BER e/ou na eficiência ou eficácia da reação de reparo (Fan *et al.*, 2003; Wilson & Bohr, 2007).

Sendo assim, parece que componentes adicionais são necessários para permitir o acesso das maquinarias de reparo aos sítios de danos, os quais devem ter uma associação estrita com proteínas dos nucleossomos (Mitra *et al.*, 2001).

Embora a via BER seja, preferencialmente, a via de reparo de bases oxidadas, é importante ressaltar que as células são dotadas de outras maquinarias de reparo, específicas ou não para certos tipos de danos e ainda, com atividades sobrepostas. Por isso, é bastante provável que a falha no funcionamento dessas outras vias possam também estar relacionadas à neurodegeneração em diversas doenças, dentre elas o Alzheimer.

Dois doenças hereditárias nas quais os pacientes apresentam sinais de anormalidades neurológicas são conhecidas por serem causadas por mutações em genes participantes do NER, que afetam o reparo do DNA: XP (*Xeroderma pigmentosum*) e síndrome de Cockayne (SC) (Reardon *et al.*, 1997). Estudos comprovam que alguns genes da família XP, além do reparo no DNA, também participam na transcrição, aumentando a possibilidade de que as anormalidades neurológicas em XP sejam causadas por defeitos na transcrição. Os produtos de *XPB (ERCC3)* e *XPD* são subunidades do fator de transcrição geral TFIIH (Drapkin *et al.*, 1994). Sendo assim, seria possível que alterações neurológicas nos grupos de complementação (GC) B e D possam ser causadas por defeitos na transcrição (Reardon *et al.*, 1997), bem como demonstrado no presente estudo, onde encontrou-se um repressão do gene *ERCC3*.

O reparo por excisão de nucleotídeos em mamíferos é iniciado por duas incisões, uma de cada lado da lesão, resultando na remoção do oligonucleotídeo (Huang *et al.*, 1992). Reardon e colaboradores, a fim de saberem a função dessa via de reparo em bases oxidadas e, se essa tinha alguma associação à neurodegeneração em pacientes XP (*Xeroderma pigmentosum*), delinearam um experimento, onde inseriram um substrato com bases oxidadas em sítios específicos (Reardon *et al.*, 1997). Eles viram que o reparo que ocorre para a remoção das lesões de dano oxidativo é mais lento e, dessa maneira, a função dessa via seria auxiliar na manutenção da integridade genômica, a longo prazo, em neurônios totalmente diferenciados e que, os defeitos nessa maquinaria poderiam levar à típica neurodegeneração

encontrada nos pacientes XP e mais, essas observações apóiam outros modelos de dano no DNA em outras doenças neurodegenerativas (Robbins, 1987).

Embora etiologicamente distintas, não se pode descartar a possibilidade dessa via de reparo ter também algum tipo de relação com DA. Embora esse seja sabidamente um mecanismo que pouco participa na remoção de bases oxidadas, defeitos no seu sistema podem contribuir para o declínio cognitivo em pacientes com Alzheimer e talvez assim, a repressão transcricional dos da via NER (*ERCC1*, *ERCC3/XPB* e *ERCC6/CSB*), indique que a transcrição deficiente desses genes possa estar implicada na patofisiologia e, mais ainda, mostra que outras vias alternativas de reparo de danos oxidativos também são importantes na manutenção e prevenção da DA.

As vias de reparo de quebras de fita simples e duplas também parecem atuar no mecanismo de defesa contra o dano oxidativo. Uma incidência duas vezes maior de quebras de fita simples e outras lesões álcali-lábeis no DNA fora encontrada no córtex cerebral de pacientes DA *versus* indivíduos controles. A contribuição dos radicais livres na clivagem do DNA, processo incompleto de reparo do DNA, ou clivagem de endonucleases (como parte da cascata apoptótica) para a formação das quebras no DNA não é ainda bem conhecida (Davydov *et al.*, 2003). Ainda, se a fragmentação do DNA se acumula durante a progressão da doença ou se ocorre durante o período de *perimortem*, ainda é uma questão a ser respondida.

Além das atividades reduzidas de BER nas células neuronais, já discutidas, Boerrigter e colegas demonstraram a capacidade também reduzida de reparo em fibroblastos e linfócitos humanos derivados de alguns pacientes de Alzheimer familiar (Boerrigter *et al.*, 1992).

#### *Expressão de gene sensores de danos e de genes de reparo do DNA*

No presente trabalho, foram estudados vários genes relacionados ao sensoriamento e sinalização do dano e de reparo, quanto aos perfis transcricionais em pacientes DA *versus* controle. Dos genes avaliados, realmente, todos se mostraram reprimidos, sendo eles: *ATM* (FC= -5,94), *ATR* (FC= -3,64), *TREX1 (ATRIP)* (FC =-1,86), *PRKDC* (FC= -1,84), *RAD17* (FC= -1,84), *RAD9* (FC= -0,95), *HUS1* (FC= -1,48) e *RAD1* (FC = -0,63); e *FEN1* (FC= -1,22), *FANCG* (FC= -3,15), *ERCC1* (FC= -0,97), *ERCC3 (XPB)* (FC= -1,30) e *ERCC6 (CSB)* (FC= -3,73).

Os genes *ATM (Ataxia telangiectasia related)* e *ATM (Ataxia telangiectasia mutated)* compartilham seqüências homólogas e muitos substratos, porém, são ativados por estímulos diferentes. A ATM permanece inativa em células intactas sob a forma de oligômeros, com o

domínio quinase de uma molécula ligada intermolecularmente ao domínio FAT (*Focal Adhesion Target*) de outra molécula (Bakkenist & Kastan, 2003). Quando submetidas às radiações, as células induzem uma rápida autofosforilação intermolecular da serina 1981 e a dissociação do dímero, levando à ativação da sinalização da quinase ATM. A associação com o complexo Mre11-Rad50-Nbs1 também pode facilitar a monomerização e ativação de ATM (Lee & Paull, 2005).

O mecanismo de ativação de ATR é menos conhecido e, provavelmente, deve envolver o recrutamento para sítios de DNA lesionado e interação com estruturas específicas do DNA (Byun *et al.*, 2005; Cortez, 2005). A ATR existe em um complexo estável, com uma proteína associada, a ATRIP (*ATR-interacting protein*) (Cortez *et al.*, 2001).

Mutações homozigóticas no gene da ATM pode causar a doença humana genética denominada Ataxia telangiectasia (A-T), a qual é caracterizada pela degeneração cerebelar, imunodeficiência, predisposição ao câncer e sensibilidade aguda às radiações ionizantes (Kondo *et al.*, 2001). Os indivíduos afetados parecem ter predisposição ao desenvolvimento de leucemia prolinfocítica de células T, leucemia linfocítica crônica de células B, bem como ao câncer de cólon esporádico com instabilidade de microssatélite (Ellison & Stillman, 2003). Além disso, a ATM parece ter uma relação estrita com outros tipos de câncer; por exemplo, estudos relativamente recentes encontraram uma ocorrência alta incomum de pacientes com câncer de mama aparentados com indivíduos A-T (Shen *et al.*, 2000).

A ATR e ATRIP colocalizam em *foci* nucleares distintos após a indução de danos no DNA (Cortez *et al.*, 2001). Esses *foci* nucleares são acúmulos de proteínas de *checkpoint* e reparo do DNA nos sítios das lesões, embora não seja conhecido o grande acúmulo das proteínas de *checkpoint* é necessário para o funcionamento apropriado desses mecanismos (Lisby & Rothstein, 2004; Ball *et al.*, 2005).

Nenhuma doença humana parece ter ligação com os defeitos em ATR, embora tenha sido relatado que a deficiência de ATR leva à mortalidade embrionária em camundongos, sugerindo que a ATR é de vital importância para o desenvolvimento (Brown & Baltimore, 2000; de Klein *et al.*, 2000). Não obstante, sabe-se que a modulação positiva da forma inativa de ATR exerce um efeito negativo, causando um aumento nos limiares de estímulo em resposta aos danos no DNA e falhas na ativação dos *checkpoints* do ciclo celular em resposta às radiações ionizantes (Cliby *et al.*, 1998). Por outro lado, o estímulo da forma ativa de ATR pode restaurar o *checkpoint* da fase S (defectivo em células A-T), o que sugere que a ATM e ATR têm papéis complementares nas respostas ao estresse genotóxico (Cliby *et al.*, 1998).

Um achado bastante curioso no presente trabalho foi a falta de modulação do gene *DUSP1*. Esse gene é parte integrante da família MAPK quinase (MAPKK), cujas proteínas são componentes iniciais nos processos de sinalização celular. Uma vez fosforiladas, as MAPKKs fosforilam os resíduos de treonina e tirosina das MAPKs. Uma vez ativadas as MAPKs se translocam para o núcleo e fosforilam as proteínas-alvo, incluindo muitos fatores de transcrição, dentre eles o TP53, o qual tem uma função fundamental na resposta celular ao estresse genotóxico, sendo considerado um sensor universal de resposta ao estresse genotóxico (Yang *et al.*, 2004).

*DUSP1* provavelmente tem um papel importante na resposta celular humana ao estresse ambiental, além de contribuir na regulação negativa da proliferação celular (Keyse & Emslie, 1992). Sendo assim, a expressão semelhante desse gene entre os pacientes DA e os controles, encontrada aqui, sugere que o processo de reconhecimento dos danos presentes em pacientes Alzheimer seja independente da atividade de *DUSP1*, sendo reconhecidas por outras MAPK quinases, ou que as proteínas e/ou vias afetadas no desenvolvimento da doença não devem afetar os processos transcricionais de *DUSP1*. Ainda, há a possibilidade de que ela seja ativada normalmente e que o problema resida nas proteínas mais *downstream*, isto é, a *DUSP1* é sintetizada normalmente, mas ela pode não ser capaz de fosforilar as proteínas subseqüentes, talvez por elas terem as funções deficientes ou por não terem sido transcritas. Além disso, embora mantenha a transcrição do mRNA em níveis normais, a sua tradução pode também ser deficiente.

Embora estudos com MAPKs (uma classe de transdutores os quais parecem ter um papel central nas respostas celulares genotóxicas) (Yang *et al.*, 2003) tenham fornecido inúmeras informações úteis a respeito de transdutores de sinais, os sensores iniciais de danos no DNA ainda precisam ser melhor investigados. Foi proposto que alguns complexos multiprotéicos que estão envolvidos na manutenção e reparo do DNA, como os membros da família Rad, Rad1, 9, 17, 26 e Hus1, podem atuar também como sensores de danos (Lowndes & Murguia, 2000; Roos-Mattjus *et al.*, 2002).

Os ortólogos de Rad9, Hus1, Rad1, os quais formam o complexo Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1), são altamente conservados e participam na ativação dos *checkpoints* em resposta ao dano no DNA. Evidências sobre as funções dessas proteínas resultaram de estudos utilizando técnicas de modelos moleculares, as quais sugeriram que os ortólogos de Rad9, Hus1 e Rad1 se assemelham estruturalmente ao antígeno de proliferação nuclear (*Proliferating Nuclear Antigen* – PCNA), um complexo homotrimérico (Thelen *et al.*, 1999; Caspari *et al.*, 2000;



Venclovas & Thelen, 2000), o qual auxilia as proteínas de duplicação no DNA durante esse processo (Bell & Dutta, 2002).

O grampo 9-1-1 interage e é carregado pela proteína de *checkpoint* Rad17. O complexo Rad17-RCF (*Replication Factor C*) carrega o 9-1-1 para o DNA *in vitro* (Ellison & Stillman, 2003; Majka & Burgers, 2003). Estudos demonstraram que o complexo 9-1-1 é um grampo que é carregado no DNA por Rad17-RCF, em resposta ao dano no DNA (Zou *et al.*, 2002).

O estresse na replicação e outros tipos de danos no DNA levam à fosforilação e ativação da proteína quinase Chk1 pela ATR. Esta, quando ativada, tem um papel fundamental nas respostas dos *checkpoints* celulares, estabilizando as forquilhas de replicação bloqueadas e bloqueando a ativação das origens tardias de duplicação, além de levar as células a um bloqueio na fase G2/M. Os membros do complexo 9-1-1, juntamente com Rad17, são participantes-chave na ativação da via Chk1. Estudos demonstraram que fibroblastos de embriões de ratos (MEF) *Hus1*<sup>-/-</sup> e células-tronco embrionárias (ES) *Rad9*<sup>-/-</sup> apresentaram falhas na ativação de Chk1 (Weiss *et al.*, 2002; Roos-Mattjus *et al.*, 2003) e a supressão de Rad9, Hus1, ou Chk1 produziam sensibilidade fenotipicamente similares às genotoxinas (Weiss *et al.*, 2002).

Porém, após a indução de dano no DNA, três vias independentes de Chk1 são ativadas. A primeira envolve o recrutamento de ATR-ATRIP na cromatina, em uma reação que não precisa do complexo 9-1-1 (You *et al.*, 2002; Zou *et al.*, 2002). Na segunda, o grampo 9-1-1 é carregado na cromatina, independentemente de Rad17 (You *et al.*, 2002; Zou *et al.*, 2002). E na terceira, a claspina, uma proteína de *checkpoint* descoberta recentemente, também é recrutada na cromatina em um processo independente de ATR e 9-1-1 (Kumagai & Dunphy, 2000; Lee *et al.*, 2003). O complexo 9-1-1, então ligado à cromatina, facilita a fosforilação e ativação da Chk1 mediadas por ATR (Weiss *et al.*, 2002; Roos-Mattjus *et al.*, 2003).

Em um estudo para avaliar se a atividade das vias de reparo em pacientes Alzheimer é comprometida, Davydov e colaboradores detectaram alterações na expressão e atividade das proteínas envolvidas no reparo de SSBs e bases oxidadas nesses indivíduos; além disso, a atividade de ligação da subunidade regulatória de Ku em DNA-PK, uma enzima sinalizadora de danos de SSB e DSB (importante proteína sinalizador no reparo NHEJ), foi reduzida em extratos nucleares do córtex médio-frontal dos pacientes (Davydov *et al.*, 2003).

*Via BASC comprometida em Alzheimer*

A ATM e ATR também interagem com muitas outras proteínas que co-localizam nos sítios de dano no DNA, dentre elas a ATM participa do super complexo de proteínas denominado complexo de vigilância do genoma associado à BRCA1 (*BRCA1-Associated Genome Surveillance Complex – BASC*).

Embora não tenha sido avaliado, sob nenhum aspecto, a transcrição e/ou ativação de BRCA1, essa participa de muitas vias, direta ou indiretamente, associadas ao sensoriamento, transdução de sinal e ativação de muitas vias de reparo no DNA. Dessa forma, BRCA1 é discutido aqui como sendo um componente de função essencial nas vias de sinalização de danos, cujos alguns genes associados à ela, foram analisados e mencionados adiante.

A proteína BRCA1 é hiperfosforilada em resposta às lesões no DNA e ao bloqueio na sua duplicação. Evidências genéticas indicam que a BRCA1 é necessária para o TCR do dano oxidativo no DNA (Gowen *et al.*, 1998), já mencionado, e para a recombinação homóloga em resposta às DSBs (Moynahan *et al.*, 1999). Além disso, a BRCA1 também parece estar envolvida no controle do *checkpoint* na fase G2/M (Xu *et al.*, 1999).

Evidências bioquímicas também apóiam o papel de BRCA1 no reparo do dano do DNA. Ela está associada e co-localiza com a proteína de reparo hRad51 (Scully *et al.*, 1997). BRCA1 também se associa e é fosforilada por ATM (Cortez *et al.*, 1999). Mais ainda, ela se associa também ao complexo RAD50-MRE11-NBS1, atuando, dessa forma, na recombinação homóloga, ligação das extremidades não-homólogas, recombinação meiótica e manutenção telomérica (Zhong *et al.*, 1999).

Apesar disso, todas as proteínas associadas à BRCA1 também são capazes de formar sub-complexos menores e estáveis, os quais provavelmente têm funções independentes de BRCA1. A BRCA1 deve, entretanto, regular as funções desses sub-complexos para uma função de reparo especializada, ou talvez, esses complexos confirmam propriedades especiais à BRCA1.

Uma característica intrigante das proteínas de reparo associadas à BRCA1, inclusive as encontradas reprimidas neste trabalho (*ATM, ATR, TREX1, FANCG, RAD17* e *PRKDC*) é que todas elas têm a capacidade de se ligarem a estruturas anormais do DNA, como DSBs, bases mal pareadas, junções de Holliday, entre outras (Uchiumi *et al.*, 1996; Alani *et al.*, 1997). Portanto, essas proteínas têm o potencial de atuar como sensoras dessas estruturas. O complexo RAD50-MRE11-NBS1 e a ATM, devem ser sensores de DSBs, uma vez que interagem e são reguladas pelas mesmas (Maser *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1999; Stewart *et al.*, 1999).

Em conjunto, os dados do presente estudo, em confronto com as informações da literatura, indicam que os processos de reparo do DNA e de percepção de danos devem estar implicados no desenvolvimento da doença de Alzheimer. A repressão transcricional de vários genes pertencentes a essas categorias, que compõem o sistema de defesa antioxidante, certamente deve contribuir para a patofisiologia da DA.

#### *Perfis de expressão gênica diferencial em pacientes DA*

No presente trabalho, foram analisados os perfis de expressão gênica em linfócitos de pacientes Alzheimer, comparativamente a um grupo controle, pareados quanto ao sexo, grau de escolaridade e excluindo qualquer tipo de demência. Foi obtida uma lista de 41 genes significativamente expressos em DA, sendo que com a exceção de *TRAP1* e *KA35*, que foram reprimidos, todos os genes apresentaram um perfil de indução da transcrição; dentre eles, podem ser citados os seguintes: *NOTCH1*, *RBM4*, *MARK3*, *SMC1L1*, *MFAP5*, *AZIN1*, *PSMB2*, *GLE1L*, *MPP5*, *PBX1* (tabela 4).

As proteínas NOTCH são receptores transmembrana que regulam as decisões do destino celular durante o desenvolvimento. A família Notch inclui 4 receptores, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3 e NOTCH4. Todos esses receptores têm domínios extracelulares contendo repetições semelhantes a múltiplos fatores de crescimento epidérmico (FCE) e uma região intracelular contendo o domínio RAM e um domínio PEST C-terminal (Das *et al.*, 2004).

A maturação da proteína NOTCH1 é mediada pela convertase semelhante à furina (Chan & Jan, 1998) durante a via secretora; a clivagem ocorre em um sítio extracelular, denominado sítio 1 (S1), após o reconhecimento da seqüência RQRR. A clivagem do sítio 2 (S2) durante processamento dessa proteína gera um peptídeo intermediário transitório, chamado NEXT (*Notch extracellular truncation*). NEXT se acumula quando a produção do domínio intracelular de NOTCH1 (DICN) é bloqueada por mutações de ponto ou inibidores de  $\gamma$ -secretases, ou por perda da presenilina-1. A inibição de NEXT elimina a produção de DICN (Brou *et al.*, 2000). Esses dados demonstram que a clivagem de S2 é um passo regulado por ligante na cascata proteolítica, levando à ativação de NOTCH1.

Brou e colaboradores purificaram a atividade da  $\gamma$ -secretase, que leva à clivagem de S2 *in vitro* e mostraram que ela acontece graças à ADAM17. Experimentos em células precursoras de monócitos da medula óssea *ADAM17*<sup>-/-</sup>, sugeriram que ADAM17 tem uma papel central na ativação da via Notch (Brou *et al.*, 2000).

A conexão entre Notch e as presenilinas 1 (PS1) e 2 (PS2) foi relatada por De Strooper et al, Struhl e Greenwald e Ye et al (De Strooper *et al.*, 1999; Struhl & Greenwald, 1999; Ye *et al.*, 1999). Os autores mostraram que mutações de perda de função no gene da presenilina em *Drosophila sp* levavam a um fenótipo letal semelhante à de Notch. De Strooper e colaboradores investigaram o efeito da presenilina no processamento de Notch, introduzindo uma forma constitutivamente ativa de Notch1 em fibroblastos de camundongos nocauteados para PS1 (De Strooper *et al.*, 1999). Em experimentos anteriores, os autores indentificaram um sítio de clivagem proteolítico localizado na região transmembrana de Notch; os autores concluíram que a presenilina é necessária para a liberação do domínio intracelular de Nocth da membrana plasmática. Analisando camundongos com nocauteamento condicional da Psen1, Yu et al verificaram que a inativação da função de Psen1 no córtex cerebral de animais adultos não afetava a expressão dos genes *downstream* de Notch (Yu *et al.*, 2001).

Conforme mencionado, um dos maiores alvos das terapias de tratamento anti-Alzheimer é a  $\gamma$ -secretase. Entretanto, essa enzima também é crítica na transdução de sinais via Notch, a qual regula o desenvolvimento e diferenciação das células renováveis em adultos (Shen *et al.*, 2004). Esse fato levou à hipótese de que a inibição terapêutica da  $\gamma$ -secretase possa interferir nos processos relacionados ao Notch em adultos, principalmente na hematopoiese. Verificou-se que a aplicação de inibidores de  $\gamma$ -secretase em culturas de timo fetal, interferia no desenvolvimento de células-T, de uma forma semelhante às observadas em culturas, nas quais a atividade de Notch1 se encontrava reduzida (Hadland *et al.*, 2001); adicionalmente, a progressão de um estado imaturo CD4-/CD8- para um estado intermediário CD4+/CD8+ foi reprimido. Esses resultados demonstraram que a inibição farmacológica da  $\gamma$ -secretase leva a efeitos semelhantes da perda de Notch1.

Notch1 também desempenha um papel relevante durante o desenvolvimento neuronal. O crescimento rápido dos neuritos durante a fase de desenvolvimento torna-se grandemente reduzido tão logo os neurônios amadurecem. Em estudos *in vitro* realizados em neurônios do córtex cerebral de camundongos, Sestan e colaboradores demonstraram que a via de contato mediado por Notch regula a capacidade dos neurônios de estenderem e elaborarem os neuritos (Sestan *et al.*, 1999). A modulação positiva da atividade de Notch foi concomitante ao aumento no número de contatos interneuronais e parada do crescimento do neurito. Em neurônios com baixa atividade de Notch, os quais rapidamente estendem os neuritos, a indução da atividade de Notch inibiu a extensão dos neuritos ou causou a sua retração. Contrariamente, em neurônios mais maduros (os quais cessaram o seu crescimento após o

estabelecimento de inúmeras conexões e com alta atividade de Notch), a inibição da via Notch promoveu a extensão dos neuritos. Portanto, os autores concluíram que a formação dos contatos neuronais resulta na ativação dos receptores Notch, levando à restrição do crescimento neuronal e a um subsequente bloqueio na maturidade.

Assim, a indução do gene *NOTCH1* observada no presente trabalho indica um sério comprometimento de vias de sinalização que regulam o desenvolvimento e diferenciação celular, o que pode ter contribuído para o desenvolvimento da doença nas pacientes DA analisadas.

Outro gene induzido neste trabalho e que, potencialmente, pode ter alguma associação com a DA é o *MARK3*. As proteínas MARK estão envolvidas na fosforilação específica das proteínas associadas ao microtúbulo da tau, MAP2 e MAP3. O gene *MARK3* foi primeiramente identificado como um marcador de estresse genotóxico, visto que este sofre indução sob tratamento com agentes causadores de danos no DNA, sendo que a perda de MAPK3 também foi encontrada na carcinogênese no pâncreas (Parsa, 1988). *MARK3* pode estar envolvido na regulação do ciclo celular e alterações no gene *MAPK3*, o que pode estar relacionado ao desenvolvimento neoplásico. O gene *MARK2* da mesma família mostrou-se reprimido em linfócitos irradiados *in vitro* com 25 e 50 cGy de raios  $\gamma$  (Fachin *et al*, *in press*), indicando a sua relação com a resposta ao estresse oxidativo.

Os genes relacionados acima apresentam uma associação mais forte com as manifestações da doença de Alzheimer. Entretanto, aparentemente, os resultados obtidos pela análise de expressão por microarranjos de DNA, realizada neste trabalho, apontaram uma lista de genes cujas funções ainda não foram relacionadas à DA. Entre estes, destacam-se os genes *SMC1L1*, *ACACB*, *AZIN1*, *PSMB2*, *PAK3*, encontrados como diferencialmente modulados, todos induzidos.

O gene *SMC1L1* participa de um complexo (coesina) responsável pela associação das cromátides irmãs durante o início da mitose. Elas se associam aos heterodímeros do complexo e os seus terminais ATPase parecem ser ligados por uma terceira subunidade, Scc1, criando um anel triangular *in vivo*. A clivagem proteolítica de Scc1 na anáfase leva à dissociação do complexo do cromossomo (Gruber *et al.*, 2003).

Deardorff e colegas identificaram 14 mutações adicionais no gene *SMC1A* em pacientes com uma variante leve da síndrome de Cornelia de Lange, com retardo mental predominante. Análise das proteínas mutantes de *SMC1A* indicou que elas capazes de produzir complexos de

coesina funcionais, entretanto, eles supuseram que essas mutações poderiam alterar as suas dinâmicas de ligação ao cromossomo (Deardorff *et al.*, 2007).

O gene *ACACB*, também induzido, codifica uma proteína envolvida na metabolização de ácidos graxos de cadeia longa, a ACC $\alpha$ . O produto da reação, malonil-CoA, o qual é gerado apenas pela ACC $\alpha$ , é o substrato para a síntese de ácidos graxos. Por outro lado, a ACC $\alpha$  é encontrada em baixos níveis em tecidos não-lipogênicos, como músculos esquelético e cardíaco, nos quais os ácidos graxos servem como fonte primária de energia. No tecido muscular, a ACC $\beta$  parece ser a necessária pelo controle da oxidação de ácidos graxos (Ha *et al.*, 1996). O gene *AZIN1* codifica a antienzima inibidora ornitina descarboxilase. A ornitina descarboxilase, uma enzima-chave na biossíntese da poliamina, é iduzida rapidamente por vários estímulos de crescimento e diferenciação celular. Em ratos, essa enzima é regulada pelo produto gênico de *OAZIN* (homólogo de *AZIN1* em ratos), o qual inibe a atividade da ornitina descarboxilase e acelera a sua degradação proteassomal.

A observação na indução do gene *PSMB2* mostrou-se interessante, uma vez que este é responsável pela tradução da proteína proteassoma 26S, a qual é um complexo protéico multi-subunidade envolvido na degradação de proteínas constitutivas de vida curta, proteínas regulatórias e proteínas anormais ou mal dobradas. Ele é composto por um proteinase catalítica 20S de 700 kD e módulos regulatórios PA700. As subunidades de PA700 são divididas entre uma família de ATPases e outra de não-ATPases. Assim, a repressão transcricional de *PSMB2* em pacientes DA pode comprometer a eficiência do sistema proteassoma, o que leva a um acúmulo de proteínas alteradas. Há evidências atuais de que a causa da degeneração neuronal em DA provavelmente se relaciona ao estresse oxidativo associado à eficiência do sistema ubiquitina-proteassoma (Nakagawa & Yokosawa, 2000).

Também foi encontrado um gene induzido, ligado à estrutura e plasticidade de células nervosas, o *PAK3*. As proteínas PAK são efetoras importantes que ligam as Rho GTPases à reorganização do citoesqueleto e sinalização nuclear. Essas proteínas servem como alvos para as proteínas ligadoras de GTP, Cdc42 e RAC e, parece estarem implicadas em uma gama de atividades biológicas. A proteína codificada por esse gene, forma um complexo ativado, com vários domínios que, então, cataliza uma variedade de alvos. Essa proteína pode ser necessária para o desenvolvimento dendrítico e para a rápida reorganização do citoesqueleto nas espinhas dendríticas, associadas à plasticidade sináptica. Uma mutação de ponto nesse gene foi relacionada a um retardo mental ligado ao X não-sindrômico.

Enfim, o advento de terapias eficazes para o tratamento de Alzheimer pressupõe a consideração de todas as vias patofisiológicas inerentes à doença. A análise de perfis de expressão gênica aberrantes no sistema nervoso central desses pacientes é impossível de ser realizada e a possibilidade da degradação *post mortem* do RNA e modificações na proteína podem gerar erros na interpretação dos dados derivados de amostras desse tipo. Essa má interpretação pode ser corrigida pela análise de tecidos periféricos dos pacientes DA, à luz de evidências relevantes sobre desarranjos sistêmicos nas funções-chave celulares em indivíduos afetados, incluindo alterações no metabolismo de APP, nos processos de defesa antioxidante e modificações protéicas pós-traducionais (Schipper *et al.*, 2000; Colciaghi *et al.*, 2004). Desta forma, o perfil de expressão de células mononucleadas do sistema sangüíneo, pode oferecer vantagens consideráveis na decifração de assinaturas aberrantes na regulação gênica em pacientes DA, pelo fato (1) dessas células serem coletadas facilmente por punção venosa; (2) do sistema nervoso central se comunicar com o sistema imune por múltiplos mecanismos (molecular, hormonal e por neurotransmissores) (Puglielli *et al.*, 2001); (3) da expressão anormal de APP, níveis alterados de enzimas antioxidantes, dano oxidativo no DNA, RNA e proteínas, desregulação da secreção de citocinas e taxas aumentadas de apoptose serem compartilhadas pelo cérebro de DA e linfócitos (Bergman *et al.*, 2002; Mecocci *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2004); e (4) pelas células do tecido sangüíneo já terem sido empregadas no diagnóstico e prognóstico de outras doenças neurológicas (Shan *et al.*, 2003; Kalman *et al.*, 2005).

O conceito de que essas células podem constituir uma janela para o sistema nervoso central já havia sido proposto por Percy e colegas, em uma revisão a respeito das manifestações periféricas de DA (Percy *et al.*, 2000). Maes e colaboradores compararam os perfis de expressão gênica de ~ 6.000 genes em linfócitos do sangue periférico derivados de pacientes Alzheimer (grau leve) e em controles, rigorosamente pareados pelos fatores de risco da doença (Maes *et al.*, 2006). Pelo método de microarranjos, os autores verificaram diferenças significativas nos padrões de expressão entre os pacientes DA e o grupo controle.

Assim, é provável que a indução transcricional dos vários genes mencionados, observada no estudo de expressão gênica (por microarranjos de cDNA), tenham contribuído de forma crucial para o desenvolvimento e progressão da DA nas pacientes. Visto que os genes induzidos desempenham papéis importantes ligados a processos vitais, a deficiência dos produtos gênicos leva a um sério comprometimento das vias metabólicas e da cadeia complexa de transdução de sinais em vários níveis celulares.

Além disso, o fato de uma série de genes apresentarem perfis de indução transcricional alterados em linfócitos de pacientes DA sugerem fortemente que a modulação da transcrição de genes biomarcadores de exposição a agentes genotóxicos deve contribuir consideravelmente, ao longo da vida, na patogênese das doenças neurodegenerativas. Entretanto, tais genes deverão ainda ser pesquisados para uma melhor compreensão de seus papéis associados à DA.



## CONCLUSÃO

O controle do estado redox celular é um processo complexo governado por uma miscelânea de fatores e sistemas. Para manter a homeostase redox, as células aeróbicas desenvolveram uma série de meios de detecção de alterações nos níveis de diferentes tipos de ROS e ativação de uma rede intrincada de neutralização e reparo. O funcionamento deficiente desses sistemas celulares pode levar ao processo de neurodegeneração e a doenças associadas a ele, dentre eles a doença de Alzheimer.

Acerca disso, foi verificado no presente trabalho alterações nos níveis transcricionais de genes relacionados à percepção e reparo dos danos no DNA causados pelo estresse oxidativo, em pacientes com a doença de Alzheimer. Adicionalmente, genes associados às vias anabólica e catabólica da proteína amilóide $\beta$  também foram encontrados alterados, o que indicou uma relação forte com a patologia. Dos vinte genes analisados, apenas a *APOE* mostrou-se induzida, enquanto 19 genes (*ADAM17*, *APEX1*, *APP*, *BACE1*, *OGG1*, *ATM*, *ATR*, *TREX1*, *FEN1*, *FANCG*, *RAD17*, *DUSP*, *ERCC1*, *ERCC3*, *ERCC6*, *HUS1*, *RAD9*, *RAD1*, *PRKDC*) foram reprimidos transcricionalmente.

A repressão ao nível de transcrição verificada para a maior parte desses genes indica múltiplas vias de sinalização implicadas na condição DA. Além disso, pelo fato de os genes ligados à sinalização do dano terem sido também reprimidos, supõe-se que a inibição dos níveis de transcrição dos genes de reparo (mais *downstream*) possa resultar da repressão dos genes sinalizadores, gerando um efeito cascata.

Embora a literatura tenha relatado níveis maiores de oxidação no DNA em pacientes DA, os dados obtidos pelo teste do Cometa mostraram o contrário; foram encontrados níveis maiores de quebras no DNA em linfócitos de mulheres do grupo controle (tratados com a enzima OGG1) em relação ao grupo das pacientes. Isso poderia ser explicado, parcialmente, pela repressão de *APEX1* (avaliada em nosso trabalho), que provavelmente pode levar à indução de apoptose, ou ainda, pelo fato de componentes adicionais serem necessários para permitir uma atividade ótima da enzima.

Adicionalmente, a análise de expressão gênica por microarranjos de cDNA indicou uma série de 41 genes diferencialmente modulados ( $q < 0,061$ ), mas para a maioria destes não há relatos na literatura sobre qualquer relação com DA. Dentre eles, o gene *NOTCH1* pareceu ser um componente interessante, pois este interage diretamente com *ADAM17* e está envolvido no crescimento e desenvolvimento neuronal. Além disso, o seu produto também se associa às

proteínas catabólicas da amilóide  $\beta$  (PS1 e PS2). Por essa razão, o método de microarranjos de cDNA aponta novas vias alteradas na condição DA, o que pode contribuir para futuras intervenções terapêuticas. Vários genes indicados como significativamente modulados apresentam um papel relacionado ao estresse genotóxico, tais como os genes MARK3 e SMC1. Um outro gene, PSMB2, tem a sua função ligada à tradução da proteína proteassoma 26S, complexo envolvido na degradação de proteínas (sistema ubiquitina-proteassomo).

Ainda, embora o presente estudo tenha sido realizado com amostras de linfócitos, pela facilidade com que estas podem ser coletadas, sem qualquer método invasivo, os resultados parecem indicar a validade desse estudo quando se deseja realizar um ensaio longitudinal metuculoso, que possa caracterizar o processo de falta de regulação gênica em vários estágios do transtorno cognitivo leve e na condição DA, bem como facilitar a avaliação da progressão da doença e, possivelmente, auxiliar no diagnóstico diferencial da demência no envelhecimento.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Abraham, R. T. (2001). "Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases." *Genes Dev* 15(17): 2177-96.
- Alani, E., S. Lee, et al. (1997). "Saccharomyces cerevisiae MSH2, a mispaired base recognition protein, also recognizes Holliday junctions in DNA." *J Mol Biol* 265(3): 289-301.
- Allinson, T. M., E. T. Parkin, et al. (2003). "ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases." *J Neurosci Res* 74(3): 342-52.
- Arai, T., V. P. Kelly, et al. (2003). "Cell proliferation in liver of Mmh/Ogg1-deficient mice enhances mutation frequency because of the presence of 8-hydroxyguanine in DNA." *Cancer Res* 63(14): 4287-92.
- Association, A. P. (1987). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*. Washington, American Psychiatric Association.
- Backstrom, J. R., G. P. Lim, et al. (1996). "Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) is synthesized in neurons of the human hippocampus and is capable of degrading the amyloid-beta peptide (1-40)." *J Neurosci* 16(24): 7910-9.
- Bakkenist, C. J. and M. B. Kastan (2003). "DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation." *Nature* 421(6922): 499-506.
- Ball, H. L., J. S. Myers, et al. (2005). "ATRIP binding to replication protein A-single-stranded DNA promotes ATR-ATRIP localization but is dispensable for Chk1 phosphorylation." *Mol Biol Cell* 16(5): 2372-81.
- Barger, S. W., D. Horster, et al. (1995). "Tumor necrosis factors alpha and beta protect neurons against amyloid beta-peptide toxicity: evidence for involvement of a kappa B-binding factor and attenuation of peroxide and Ca<sup>2+</sup> accumulation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(20): 9328-32.
- Barzilaj, A. and K. Yamamoto (2004). "DNA damage responses to oxidative stress." *DNA Repair (Amst)* 3(8-9): 1109-15.
- Baum, L., L. Chen, et al. (2000). "Apolipoprotein E isoforms in Alzheimer's disease pathology and etiology." *Microsc Res Tech* 50(4): 278-81.
- Beffert, U. and J. Poirier (1996). "Apolipoprotein E, plaques, tangles and cholinergic dysfunction in Alzheimer's disease." *Ann N Y Acad Sci* 777: 166-74.
- Beffert, U. and J. Poirier (1998). "ApoE associated with lipid has a reduced capacity to inhibit beta-amyloid fibril formation." *Neuroreport* 9(14): 3321-3.
- Behl, C. and Y. Sagara (1997). "Mechanism of amyloid beta protein induced neuronal cell death: current concepts and future perspectives." *J Neural Transm Suppl* 49: 125-34.
- Behl, C., J. B. Davis, et al. (1994). "Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity." *Cell* 77(6): 817-27.
- Bell, S. P. and A. Dutta (2002). "DNA replication in eukaryotic cells." *Annu Rev Biochem* 71: 333-74.
- Benzi, G., A. Moretti, et al. (1995). "Are reactive oxygen species involved in Alzheimer's disease?"
- Berg, L., D. W. McKeel, Jr., et al. (1998). "Clinicopathologic studies in cognitively healthy aging and Alzheimer's disease: relation of histologic markers to dementia severity, age, sex, and apolipoprotein E genotype." *Arch Neurol* 55(3): 326-35.
- Bergman, M., H. Salman, et al. (2002). "Are peripheral blood cells from patients with Alzheimer disease more sensitive to apoptotic stimuli?" *Alzheimer Dis Assoc Disord* 16(3): 156-60.
- Blacker, D., L. Bertram, et al. (2003). "Results of a high-resolution genome screen of 437 Alzheimer's disease families." *Hum Mol Genet* 12(1): 23-32.
- Boerrigter, M. E., J. Y. Wei, et al. (1992). "DNA repair and Alzheimer's disease." *J Gerontol* 47(6): B177-84.
- Boiteux, S. and J. P. Radicella (2000). "The human OGG1 gene: structure, functions, and its implication in the process of carcinogenesis." *Arch Biochem Biophys* 377(1): 1-8.
- Brou, C., F. Logeat, et al. (2000). "A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE." *Mol Cell* 5(2): 207-16.
- Brown, E. J. and D. Baltimore (2000). "ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality." *Genes Dev* 14(4): 397-402.
- Buxbaum, J. D., K. N. Liu, et al. (1998). "Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor." *J Biol Chem* 273(43): 27765-7.
- Byun, T. S., M. Pacek, et al. (2005). "Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint." *Genes Dev* 19(9): 1040-52.
- Campion, D., C. Dumanchin, et al. (1999). "Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum." *Am J Hum Genet* 65(3): 664-70.
- Caporaso, G. L., S. E. Gandy, et al. (1992). "Protein phosphorylation regulates secretion of Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(7): 3055-9.

- Carvalho, K. M., M. S. Franca, et al. (1997). "A new brain metalloendopeptidase which degrades the Alzheimer beta-amyloid 1-40 peptide producing soluble fragments without neurotoxic effects." *Braz J Med Biol Res* 30(10): 1153-6.
- Caspari, T., M. Dahlen, et al. (2000). "Characterization of *Schizosaccharomyces pombe* Hus1: a PCNA-related protein that associates with Rad1 and Rad9." *Mol Cell Biol* 20(4): 1254-62.
- Chan, Y. M. and Y. N. Jan (1998). "Roles for proteolysis and trafficking in notch maturation and signal transduction." *Cell* 94(4): 423-6.
- Chapman, J., C. Sylantiev, et al. (1999). "Preliminary observations on APOE epsilon4 allele and progression of disability in multiple sclerosis." *Arch Neurol* 56(12): 1484-7.
- Charames, G. S. and B. Bapat (2003). "Genomic instability and cancer." *Curr Mol Med* 3(7): 589-96.
- Christen, Y. (2000). "Oxidative stress and Alzheimer disease." *Am J Clin Nutr* 71(2): 621S-629S.
- Cliby, W. A., C. J. Roberts, et al. (1998). "Overexpression of a kinase-inactive ATR protein causes sensitivity to DNA-damaging agents and defects in cell cycle checkpoints." *Embo J* 17(1): 159-69.
- Colciaghi, F., E. Marcello, et al. (2004). "Platelet APP, ADAM 10 and BACE alterations in the early stages of Alzheimer disease." *Neurology* 62(3): 498-501.
- Cooper, P. K., T. Nospikel, et al. (1997). "Defective transcription-coupled repair of oxidative base damage in Cockayne syndrome patients from XP group G." *Science* 275(5302): 990-3.
- Cortez, D. (2005). "Unwind and slow down: checkpoint activation by helicase and polymerase uncoupling." *Genes Dev* 19(9): 1007-12.
- Cortez, D., S. Guntuku, et al. (2001). "ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling." *Science* 294(5547): 1713-6.
- Cortez, D., Y. Wang, et al. (1999). "Requirement of ATM-dependent phosphorylation of brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks." *Science* 286(5442): 1162-6.
- Das, I., C. Craig, et al. (2004). "Notch oncoproteins depend on gamma-secretase/presenilin activity for processing and function." *J Biol Chem* 279(29): 30771-80.
- Davydov, V., L. A. Hansen, et al. (2003). "Is DNA repair compromised in Alzheimer's disease?" *Neurobiol Aging* 24(7): 953-68.
- de Boer, J., J. O. Andressoo, et al. (2002). "Premature aging in mice deficient in DNA repair and transcription." *Science* 296(5571): 1276-9.
- de Klein, A., M. Muijtjens, et al. (2000). "Targeted disruption of the cell-cycle checkpoint gene ATR leads to early embryonic lethality in mice." *Curr Biol* 10(8): 479-82.
- De Strooper, B., W. Annaert, et al. (1999). "A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain." *Nature* 398(6727): 518-22.
- Deardorff, M. A., M. Kaur, et al. (2007). "Mutations in cohesin complex members SMC3 and SMC1A cause a mild variant of cornelia de Lange syndrome with predominant mental retardation." *Am J Hum Genet* 80(3): 485-94.
- Demple, B. and J. S. Sung (2005). "Molecular and biological roles of Ape1 protein in mammalian base excision repair." *DNA Repair (Amst)* 4(12): 1442-9.
- Demple, B. and L. Harrison (1994). "Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology." *Annu Rev Biochem* 63: 915-48.
- Di Luca, M., L. Pastorino, et al. (1998). "Differential level of platelet amyloid beta precursor protein isoforms: an early marker for Alzheimer disease." *Arch Neurol* 55(9): 1195-200.
- Drapkin, R., J. T. Reardon, et al. (1994). "Dual role of TFIIH in DNA excision repair and in transcription by RNA polymerase II." *Nature* 368(6473): 769-72.
- Durocher, D. and S. P. Jackson (2001). "DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: variations on a theme?" *Curr Opin Cell Biol* 13(2): 225-31.
- Dyrks, T., E. Dyrks, et al. (1992). "Amyloidogenicity of beta A4 and beta A4-bearing amyloid protein precursor fragments by metal-catalyzed oxidation." *J Biol Chem* 267(25): 18210-7.
- Eckman, E. A., D. K. Reed, et al. (2001). "Degradation of the Alzheimer's amyloid beta peptide by endothelin-converting enzyme." *J Biol Chem* 276(27): 24540-8.
- Ellison, V. and B. Stillman (2003). "Biochemical characterization of DNA damage checkpoint complexes: clamp loader and clamp complexes with specificity for 5' recessed DNA." *PLoS Biol* 1(2): E33.
- Evans, A. R., M. Limp-Foster, et al. (2000). "Going APE over ref-1." *Mutat Res* 461(2): 83-108.
- Fan, Z., P. J. Beresford, et al. (2003). "Cleaving the oxidative repair protein Ape1 enhances cell death mediated by granzyme A." *Nat Immunol* 4(2): 145-53.
- Folstein, M. F., S. E. Folstein, et al. (1975). "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician." *J Psychiatr Res* 12(3): 189-98.
- Fukumoto, H., B. S. Cheung, et al. (2002). "Beta-secretase protein and activity are increased in the neocortex in Alzheimer disease." *Arch Neurol* 59(9): 1381-9.
- Gearing, M., H. Mori, et al. (1996). "Abeta-peptide length and apolipoprotein E genotype in Alzheimer's disease." *Ann Neurol* 39(3): 395-9.
- Goodman, Y. and M. P. Mattson (1996). "Ceramide protects hippocampal neurons against excitotoxic and oxidative insults, and amyloid beta-peptide toxicity." *J Neurochem* 66(2): 869-72.

- Gowen, L. C., A. V. Avrutskaya, et al. (1998). "BRCA1 required for transcription-coupled repair of oxidative DNA damage." *Science* 281(5379): 1009-12.
- Grilli, M., M. Pizzi, et al. (1996). "Neuroprotection by aspirin and sodium salicylate through blockade of NF-kappaB activation." *Science* 274(5291): 1383-5.
- Gruber, S., C. H. Haering, et al. (2003). "Chromosomal cohesin forms a ring." *Cell* 112(6): 765-77.
- Guo, Z., L. A. Cupples, et al. (2000). "Head injury and the risk of AD in the MIRAGE study." *Neurology* 54(6): 1316-23.
- Ha, J., J. K. Lee, et al. (1996). "Cloning of human acetyl-CoA carboxylase-beta and its unique features." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(21): 11466-70.
- Haass, C. (2004). "Take five--BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation." *Embo J* 23(3): 483-8.
- Haass, C., M. G. Schlossmacher, et al. (1992). "Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism." *Nature* 359(6393): 322-5.
- Hachinski, V. C., L. D. Iliff, et al. (1975). "Cerebral blood flow in dementia." *Arch Neurol* 32(9): 632-7.
- Hadland, B. K., N. R. Manley, et al. (2001). "Gamma -secretase inhibitors repress thymocyte development." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(13): 7487-91.
- Hamazaki, H. (1996). "Cathepsin D is involved in the clearance of Alzheimer's beta-amyloid protein." *FEBS Lett* 396(2-3): 139-42.
- Hammond, E. M., M. J. Dorie, et al. (2003). "ATR/ATM targets are phosphorylated by ATR in response to hypoxia and ATM in response to reoxygenation." *J Biol Chem* 278(14): 12207-13.
- Harrison, J. F., S. B. Hollensworth, et al. (2005). "Oxidative stress-induced apoptosis in neurons correlates with mitochondrial DNA base excision repair pathway imbalance." *Nucleic Acids Res* 33(14): 4660-71.
- Hasty, P., J. Campisi, et al. (2003). "Aging and genome maintenance: lessons from the mouse?" *Science* 299(5611): 1355-9.
- Hazel, J. R. and E. E. Williams (1990). "The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment." *Prog Lipid Res* 29(3): 167-227.
- Hazra, T. K., J. W. Hill, et al. (2001). "Multiple DNA glycosylases for repair of 8-oxoguanine and their potential in vivo functions." *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 68: 193-205.
- Helbecque, N. and P. Amouyel (2000). "Very low density lipoprotein receptor in Alzheimer disease." *Microsc Res Tech* 50(4): 273-7.
- Holsinger, R. M., C. A. McLean, et al. (2002). "Increased expression of the amyloid precursor beta-secretase in Alzheimer's disease." *Ann Neurol* 51(6): 783-6.
- Hong, L., G. Koelsch, et al. (2000). "Structure of the protease domain of memapsin 2 (beta-secretase) complexed with inhibitor." *Science* 290(5489): 150-3.
- Hotoda, N., H. Koike, et al. (2002). "A secreted form of human ADAM9 has an alpha-secretase activity for APP." *Biochem Biophys Res Commun* 293(2): 800-5.
- Howell, S., J. Nalbantoglu, et al. (1995). "Neutral endopeptidase can hydrolyze beta-amyloid(1-40) but shows no effect on beta-amyloid precursor protein metabolism." *Peptides* 16(4): 647-52.
- Hu, J., A. Igarashi, et al. (2001). "Angiotensin-converting enzyme degrades Alzheimer amyloid beta-peptide (A beta); retards A beta aggregation, deposition, fibril formation; and inhibits cytotoxicity." *J Biol Chem* 276(51): 47863-8.
- Huang, J. C., D. L. Svoboda, et al. (1992). "Human nucleotide excision nuclease removes thymine dimers from DNA by incising the 22nd phosphodiester bond 5' and the 6th phosphodiester bond 3' to the photodimer." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(8): 3664-8.
- Huang, R., J. Huang, et al. (2007). "Genetic variants in brain-derived neurotrophic factor associated with Alzheimer's disease." *J Med Genet* 44(2): e66.
- Huffman, J. L., O. Sundheim, et al. (2005). "DNA base damage recognition and removal: new twists and grooves." *Mutat Res* 577(1-2): 55-76.
- Hughes, C. P., L. Berg, et al. (1982). "A new clinical scale for the staging of dementia." *Br J Psychiatry* 140: 566-72.
- Huse, J. T., D. Byant, et al. (2003). "Endoproteolysis of beta-secretase (beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme) within its catalytic domain. A potential mechanism for regulation." *J Biol Chem* 278(19): 17141-9.
- Ihaka, R. G., R. (1996). "R: A language for data analysis and graphics." *Journal of Computational and Graphical Statistics* 5(3): 579-588.
- Iliakis, G., Y. Wang, et al. (2003). "DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation." *Oncogene* 22(37): 5834-47.
- Iwata, N., M. Higuchi, et al. (2005). "Metabolism of amyloid-beta peptide and Alzheimer's disease." *Pharmacol Ther* 108(2): 129-48.
- Iwata, N., S. Tsubuki, et al. (2001). "Metabolic regulation of brain Abeta by neprilysin." *Science* 292(5521): 1550-2.

- Jorm, A. F., A. E. Korten, et al. (1987). "The prevalence of dementia: a quantitative integration of the literature." *Acta Psychiatr Scand* 76(5): 465-79.
- Kalman, J., K. Kitajka, et al. (2005). "Gene expression profile analysis of lymphocytes from Alzheimer's patients." *Psychiatr Genet* 15(1): 1-6.
- Keyse, S. M. and E. A. Emslie (1992). "Oxidative stress and heat shock induce a human gene encoding a protein-tyrosine phosphatase." *Nature* 359(6396): 644-7.
- Kim, H. S., J. H. Lee, et al. (2002). "Amyloid beta peptide induces cytochrome C release from isolated mitochondria." *Neuroreport* 13(15): 1989-93.
- Klungland, A. and T. Lindahl (1997). "Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1)." *Embo J* 16(11): 3341-8.
- Klungland, A., I. Rosewell, et al. (1999). "Accumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(23): 13300-5.
- Kohen, R. and A. Nyska (2002). "Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification." *Toxicol Pathol* 30(6): 620-50.
- Kojro, E., G. Gimpl, et al. (2001). "Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha-secretase ADAM 10." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(10): 5815-20.
- Kondo, T., T. Wakayama, et al. (2001). "Recruitment of Mec1 and Ddc1 checkpoint proteins to double-strand breaks through distinct mechanisms." *Science* 294(5543): 867-70.
- Krokan, H. E., H. Nilsen, et al. (2000). "Base excision repair of DNA in mammalian cells." *FEBS Lett* 476(1-2): 73-7.
- Kruman, II, E. Schwartz, et al. (2004). "Suppression of uracil-DNA glycosylase induces neuronal apoptosis." *J Biol Chem* 279(42): 43952-60.
- Kumagai, A. and W. G. Dunphy (2000). "Claspin, a novel protein required for the activation of Chk1 during a DNA replication checkpoint response in *Xenopus* egg extracts." *Mol Cell* 6(4): 839-49.
- Kuo, Y. M., M. R. Emmerling, et al. (1996). "Water-soluble Abeta (N-40, N-42) oligomers in normal and Alzheimer disease brains." *J Biol Chem* 271(8): 4077-81.
- Kurochkin, I. V. and S. Goto (1994). "Alzheimer's beta-amyloid peptide specifically interacts with and is degraded by insulin degrading enzyme." *FEBS Lett* 345(1): 33-7.
- LaDu, M. J., M. T. Falduto, et al. (1994). "Isoform-specific binding of apolipoprotein E to beta-amyloid." *J Biol Chem* 269(38): 23403-6.
- Lambert, M. P., A. K. Barlow, et al. (1998). "Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(11): 6448-53.
- Lammich, S., E. Kojro, et al. (1999). "Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(7): 3922-7.
- Lee, J. H. and T. T. Paull (2005). "ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex." *Science* 308(5721): 551-4.
- Lee, J., A. Kumagai, et al. (2003). "Claspin, a Chk1-regulatory protein, monitors DNA replication on chromatin independently of RPA, ATR, and Rad17." *Mol Cell* 11(2): 329-40.
- Lendon, C. L., F. Ashall, et al. (1997). "Exploring the etiology of Alzheimer disease using molecular genetics." *Jama* 277(10): 825-31.
- Leroy, C., C. Mann, et al. (2001). "Silent repair accounts for cell cycle specificity in the signaling of oxidative DNA lesions." *Embo J* 20(11): 2896-906.
- Lezoualc'h, F., Y. Sagara, et al. (1998). "High constitutive NF-kappaB activity mediates resistance to oxidative stress in neuronal cells." *J Neurosci* 18(9): 3224-32.
- Li, R., K. Lindholm, et al. (2004). "Amyloid beta peptide load is correlated with increased beta-secretase activity in sporadic Alzheimer's disease patients." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(10): 3632-7.
- Lichtenthaler, S. F. and C. Haass (2004). "Amyloid at the cutting edge: activation of alpha-secretase prevents amyloidogenesis in an Alzheimer disease mouse model." *J Clin Invest* 113(10): 1384-7.
- Lindahl, T. and R. D. Wood (1999). "Quality control by DNA repair." *Science* 286(5446): 1897-905.
- Lippa, C. F., T. W. Smith, et al. (1997). "Apolipoprotein E-epsilon 2 and Alzheimer's disease: genotype influences pathologic phenotype." *Neurology* 48(2): 515-9.
- Lisby, M. and R. Rothstein (2004). "DNA damage checkpoint and repair centers." *Curr Opin Cell Biol* 16(3): 328-34.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C(T)</sup> Method." *Methods* 25(4): 402-8.
- Lombard, D. B., K. F. Chua, et al. (2005). "DNA repair, genome stability, and aging." *Cell* 120(4): 497-512.
- Lowndes, N. F. and J. R. Murguia (2000). "Sensing and responding to DNA damage." *Curr Opin Genet Dev* 10(1): 17-25.
- Maes, O. C., S. Xu, et al. (2006). "Transcriptional profiling of Alzheimer blood mononuclear cells by microarray." *Neurobiol Aging*.

- Majka, J. and P. M. Burgers (2003). "Yeast Rad17/Mec3/Ddc1: a sliding clamp for the DNA damage checkpoint." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(5): 2249-54.
- Mao, G., X. Pan, et al. (2007). "Identification and characterization of OGG1 mutations in patients with Alzheimer's disease." *Nucleic Acids Res* 35(8): 2759-66.
- Maser, R. S., K. J. Monsen, et al. (1997). "hMre11 and hRad50 nuclear foci are induced during the normal cellular response to DNA double-strand breaks." *Mol Cell Biol* 17(10): 6087-96.
- Matsumoto, Y., K. Kim, et al. (1999). "Reconstitution of proliferating cell nuclear antigen-dependent repair of apurinic/aprimidinic sites with purified human proteins." *J Biol Chem* 274(47): 33703-8.
- Mayeux, R., Y. Stern, et al. (1993). "The apolipoprotein epsilon 4 allele in patients with Alzheimer's disease." *Ann Neurol* 34(5): 752-4.
- McKhann, G., D. Drachman, et al. (1984). "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* 34(7): 939-44.
- Mecocci, P., M. C. Polidori, et al. (2002). "Lymphocyte oxidative DNA damage and plasma antioxidants in Alzheimer disease." *Arch Neurol* 59(5): 794-8.
- Michaels, M. L. and J. H. Miller (1992). "The GO system protects organisms from the mutagenic effect of the spontaneous lesion 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine)." *J Bacteriol* 174(20): 6321-5.
- Mills, J., D. Laurent Charest, et al. (1997). "Regulation of amyloid precursor protein catabolism involves the mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway." *J Neurosci* 17(24): 9415-22.
- Minowa, O., T. Arai, et al. (2000). "Mmh/Ogg1 gene inactivation results in accumulation of 8-hydroxyguanine in mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(8): 4156-61.
- Mitra, S., I. Boldogh, et al. (2001). "Complexities of the DNA base excision repair pathway for repair of oxidative DNA damage." *Environ Mol Mutagen* 38(2-3): 180-90.
- Miyata, M. and J. D. Smith (1996). "Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and beta-amyloid peptides." *Nat Genet* 14(1): 55-61.
- Moreira, P. I., X. Zhu, et al. (2006). "The (un)balance between metabolic and oxidative abnormalities and cellular compensatory responses in Alzheimer disease." *Mech Ageing Dev*.
- Moynahan, M. E., J. W. Chiu, et al. (1999). "Brca1 controls homology-directed DNA repair." *Mol Cell* 4(4): 511-8.
- Nakagawa, K. and H. Yokosawa (2000). "Degradation of transcription factor IRF-1 by the ubiquitin-proteasome pathway. The C-terminal region governs the protein stability." *Eur J Biochem* 267(6): 1680-6.
- Naslund, J., A. Schierhorn, et al. (1994). "Relative abundance of Alzheimer A beta amyloid peptide variants in Alzheimer disease and normal aging." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(18): 8378-82.
- Nelms, B. E., R. S. Maser, et al. (1998). "In situ visualization of DNA double-strand break repair in human fibroblasts." *Science* 280(5363): 590-2.
- Nicoll, J. A., C. Burnett, et al. (1997). "High frequency of apolipoprotein E epsilon 2 allele in hemorrhage due to cerebral amyloid angiopathy." *Ann Neurol* 41(6): 716-21.
- Nicoll, J. A., G. W. Roberts, et al. (1996). "Amyloid beta-protein, APOE genotype and head injury." *Ann N Y Acad Sci* 777: 271-5.
- Nitsch, R. M., B. E. Slack, et al. (1992). "Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors." *Science* 258(5080): 304-7.
- Nouspikel, T. and P. C. Hanawalt (2002). "DNA repair in terminally differentiated cells." *DNA Repair (Amst)* 1(1): 59-75.
- Okazaki, T., U. Chung, et al. (1994). "A redox factor protein, ref1, is involved in negative gene regulation by extracellular calcium." *J Biol Chem* 269(45): 27855-62.
- Olanow, C. W. (1992). "An introduction to the free radical hypothesis in Parkinson's disease." *Ann Neurol* 32 Suppl: S2-9.
- Otterlei, M., E. Warbrick, et al. (1999). "Post-replicative base excision repair in replication foci." *Embo J* 18(13): 3834-44.
- Padovani, A., L. Pastorino, et al. (2001). "Amyloid precursor protein in platelets: a peripheral marker for the diagnosis of sporadic AD." *Neurology* 57(12): 2243-8.
- Parker, A. R., R. N. O'Meally, et al. (2003). "Defective human MutY phosphorylation exists in colorectal cancer cell lines with wild-type MutY alleles." *J Biol Chem* 278(48): 47937-45.
- Parsa, I. (1988). "Loss of a Mr 78,000 marker in chemically induced transplantable carcinomas and primary carcinoma of human pancreas." *Cancer Res* 48(8): 2265-72.
- Paz-Elizur, T., M. Krupsky, et al. (2003). "DNA repair activity for oxidative damage and risk of lung cancer." *J Natl Cancer Inst* 95(17): 1312-9.
- Pedrini, S., T. L. Carter, et al. (2005). "Modulation of statin-activated shedding of Alzheimer APP ectodomain by ROCK." *PLoS Med* 2(1): e18.
- Percy, M. E., D. E. Andrews, et al. (2000). *Peripheral markers of Alzheimer's disease*. Totowa NJ, Human Press.

- Poirier, J. (1999). "Apolipoprotein E4, cholinergic integrity and the pharmacogenetics of Alzheimer's disease." *J Psychiatry Neurosci* 24(2): 147-53.
- Puglielli, L., G. Konopka, et al. (2001). "Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase modulates the generation of the amyloid beta-peptide." *Nat Cell Biol* 3(10): 905-12.
- Reardon, J. T., T. Bessho, et al. (1997). "In vitro repair of oxidative DNA damage by human nucleotide excision repair system: possible explanation for neurodegeneration in xeroderma pigmentosum patients." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(17): 9463-8.
- Reardon, J. T., T. Bessho, et al. (1997). "In vitro repair of oxidative DNA damage by human nucleotide excision repair system: possible explanation for neurodegeneration in xeroderma pigmentosum patients." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(17): 9463-8.
- Reiter, R. J., D. X. Tan, et al. (1994). "Melatonin as a free radical scavenger: implications for aging and age-related diseases." *Ann N Y Acad Sci* 719: 1-12.
- Robbins, J. H. (1987). "Incorrect priority claim for the DNA-damage hypothesis." *Arch Neurol* 44(6): 579-83.
- Rolig, R. L. and P. J. McKinnon (2000). "Linking DNA damage and neurodegeneration." *Trends Neurosci* 23(9): 417-24.
- Roos-Mattjus, P., B. T. Vroman, et al. (2002). "Genotoxin-induced Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) chromatin association is an early checkpoint signaling event." *J Biol Chem* 277(46): 43809-12.
- Roos-Mattjus, P., K. M. Hopkins, et al. (2003). "Phosphorylation of human Rad9 is required for genotoxin-activated checkpoint signaling." *J Biol Chem* 278(27): 24428-37.
- Sagara, Y., R. Dargusch, et al. (1996). "Increased antioxidant enzyme activity in amyloid beta protein-resistant cells." *J Neurosci* 16(2): 497-505.
- Saporito-Irwin, S. M. and W. E. Van Nostrand (1995). "Coagulation factor XIa cleaves the RHDS sequence and abolishes the cell adhesive properties of the amyloid beta-protein." *J Biol Chem* 270(44): 26265-9.
- Saunders, A. M., W. J. Strittmatter, et al. (1993). "Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease." *Neurology* 43(8): 1467-72.
- Schipper, H. M., H. Chertkow, et al. (2000). "Evaluation of heme oxygenase-1 as a systemic biological marker of sporadic AD." *Neurology* 54(6): 1297-304.
- Scully, R., J. Chen, et al. (1997). "Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells." *Cell* 88(2): 265-75.
- Selkoe, D. J. (2001). "Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy." *Physiol Rev* 81(2): 741-66.
- Serum levels of the iron binding protein p97 are elevated in Alzheimer's disease." *Neurobiol Aging* 16(4): 661-74.
- Sestan, N., S. Artavanis-Tsakonas, et al. (1999). "Contact-dependent inhibition of cortical neurite growth mediated by notch signaling." *Science* 286(5440): 741-6.
- Seubert, P., T. Oltersdorf, et al. (1993). "Secretion of beta-amyloid precursor protein cleaved at the amino terminus of the beta-amyloid peptide." *Nature* 361(6409): 260-3.
- Shan, X., H. Tashiro, et al. (2003). "The identification and characterization of oxidized RNAs in Alzheimer's disease." *J Neurosci* 23(12): 4913-21.
- Shen, C. Y., J. C. Yu, et al. (2000). "Genome-wide search for loss of heterozygosity using laser capture microdissected tissue of breast carcinoma: an implication for mutator phenotype and breast cancer pathogenesis." *Cancer Res* 60(14): 3884-92.
- Shen, Q., S. K. Goderie, et al. (2004). "Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells." *Science* 304(5675): 1338-40.
- Sherrington, R., E. I. Rogaev, et al. (1995). "Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease." *Nature* 375(6534): 754-60.
- Shiloh, Y. (2003). "ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity." *Nat Rev Cancer* 3(3): 155-68.
- Shiloh, Y. and M. B. Kastan (2001). "ATM: genome stability, neuronal development, and cancer cross paths." *Adv Cancer Res* 83: 209-54.
- Shoji, M., T. E. Golde, et al. (1992). "Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing." *Science* 258(5079): 126-9.
- Skovronsky, D. M., S. Fath, et al. (2001). "Neuronal localization of the TNFalpha converting enzyme (TACE) in brain tissue and its correlation to amyloid plaques." *J Neurobiol* 49(1): 40-6.
- Slupphaug, G., B. Kavli, et al. (2003). "The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage." *Mutat Res* 531(1-2): 231-51.
- Smith, G. C., R. B. Cary, et al. (1999). "Purification and DNA binding properties of the ataxia-telangiectasia gene product ATM." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(20): 11134-9.
- Smith, M. A., L. M. Sayre, et al. (1995). "Radical AGEing in Alzheimer's disease." *Trends Neurosci* 18(4): 172-6.
- Snowdon, D. A., L. H. Greiner, et al. (1997). "Brain infarction and the clinical expression of Alzheimer disease. The Nun Study." *Jama* 277(10): 813-7.



- Sohal, R. S. (1993). "The free radical hypothesis of aging: an appraisal of the current status." *Aging (Milano)* 5(1): 3-17.
- Sramek, J. J. and N. R. Cutler (1999). "Recent developments in the drug treatment of Alzheimer's disease." *Drugs Aging* 14(5): 359-73.
- St George-Hyslop, P., D. C. McLachlan, et al. (1994). "Alzheimer's disease and possible gene interaction." *Science* 263(5146): 537.
- Stewart, G. S., R. S. Maser, et al. (1999). "The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder." *Cell* 99(6): 577-87.
- Stivers, J. T. and Y. L. Jiang (2003). "A mechanistic perspective on the chemistry of DNA repair glycosylases." *Chem Rev* 103(7): 2729-59.
- Strittmatter, W. J., A. M. Saunders, et al. (1993). "Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(5): 1977-81.
- Struhl, G. and I. Greenwald (1999). "Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in *Drosophila*." *Nature* 398(6727): 522-5.
- Takaki, Y., N. Iwata, et al. (2000). "Biochemical identification of the neutral endopeptidase family member responsible for the catabolism of amyloid beta peptide in the brain." *J Biochem (Tokyo)* 128(6): 897-902.
- Thelen, M. P., C. Venclovas, et al. (1999). "A sliding clamp model for the Rad1 family of cell cycle checkpoint proteins." *Cell* 96(6): 769-70.
- Thomas, T., G. Thomas, et al. (1996). "beta-Amyloid-mediated vasoactivity and vascular endothelial damage." *Nature* 380(6570): 168-71.
- Tomkinson, A. E., L. Chen, et al. (2001). "Completion of base excision repair by mammalian DNA ligases." *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 68: 151-64.
- Tyler, S. J., D. Dawbarn, et al. (2002). "alpha- and beta-secretase: profound changes in Alzheimer's disease." *Biochem Biophys Res Commun* 299(3): 373-6.
- Uchiumi, F., T. Ohta, et al. (1996). "Replication factor C recognizes 5'-phosphate ends of telomeres." *Biochem Biophys Res Commun* 229(1): 310-5.
- van Duijn, C. M., D. Clayton, et al. (1991). "Familial aggregation of Alzheimer's disease and related disorders: a collaborative re-analysis of case-control studies. EURODEM Risk Factors Research Group." *Int J Epidemiol* 20 Suppl 2: S13-20.
- Van Nostrand, W. E. and M. Porter (1999). "Plasmin cleavage of the amyloid beta-protein: alteration of secondary structure and stimulation of tissue plasminogen activator activity." *Biochemistry* 38(35): 11570-6.
- Venclovas, C. and M. P. Thelen (2000). "Structure-based predictions of Rad1, Rad9, Hus1 and Rad17 participation in sliding clamp and clamp-loading complexes." *Nucleic Acids Res* 28(13): 2481-93.
- Walker, L. J., C. N. Robson, et al. (1993). "Identification of residues in the human DNA repair enzyme HAP1 (Ref-1) that are essential for redox regulation of Jun DNA binding." *Mol Cell Biol* 13(9): 5370-6.
- Walsh, D. M., I. Klyubin, et al. (2002). "Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo." *Nature* 416(6880): 535-9.
- Weiss, R. S., S. Matsuoka, et al. (2002). "Hus1 acts upstream of chk1 in a mammalian DNA damage response pathway." *Curr Biol* 12(1): 73-7.
- Wilson, D. M., 3rd and D. Barsky (2001). "The major human abasic endonuclease: formation, consequences and repair of abasic lesions in DNA." *Mutat Res* 485(4): 283-307.
- Wilson, D. M., 3rd and V. A. Bohr (2007). "The mechanics of base excision repair, and its relationship to aging and disease." *DNA Repair (Amst)* 6(4): 544-59.
- Wyss-Coray, T., E. Masliah, et al. (1997). "Amyloidogenic role of cytokine TGF-beta1 in transgenic mice and in Alzheimer's disease." *Nature* 389(6651): 603-6.
- Xanthoudakis, S., G. Miao, et al. (1992). "Redox activation of Fos-Jun DNA binding activity is mediated by a DNA repair enzyme." *Embo J* 11(9): 3323-35.
- Xu, X., Z. Weaver, et al. (1999). "Centrosome amplification and a defective G2-M cell cycle checkpoint induce genetic instability in BRCA1 exon 11 isoform-deficient cells." *Mol Cell* 3(3): 389-95.
- Yamada, T., K. Miyazaki, et al. (1995). "Selective localization of gelatinase A, an enzyme degrading beta-amyloid protein, in white matter microglia and in Schwann cells." *Acta Neuropathol (Berl)* 89(3): 199-203.
- Yang, J., Y. Yu, et al. (2003). "Protein kinases and their involvement in the cellular responses to genotoxic stress." *Mutat Res* 543(1): 31-58.
- Yang, J., Z. P. Xu, et al. (2004). "ATM and ATR: sensing DNA damage." *World J Gastroenterol* 10(2): 155-60.
- Yang, L. B., K. Lindholm, et al. (2003). "Elevated beta-secretase expression and enzymatic activity detected in sporadic Alzheimer disease." *Nat Med* 9(1): 3-4.
- Yang, Y. H. and T. Speed (2002). "Design issues for cDNA microarray experiments." *Nat Rev Genet* 3(8): 579-88.

- Ye, Y., N. Lukinova, et al. (1999). "Neurogenic phenotypes and altered Notch processing in *Drosophila* Presenilin mutants." *Nature* 398(6727): 525-9.
- You, Z., L. Kong, et al. (2002). "The role of single-stranded DNA and polymerase alpha in establishing the ATR, Hus1 DNA replication checkpoint." *J Biol Chem* 277(30): 27088-93.
- Younkin, S. G. (1995). "Evidence that A beta 42 is the real culprit in Alzheimer's disease." *Ann Neurol* 37(3): 287-8.
- Yu, H., C. A. Saura, et al. (2001). "APP processing and synaptic plasticity in presenilin-1 conditional knockout mice." *Neuron* 31(5): 713-26.
- Zaudig, M. (1992). "A new systematic method of measurement and diagnosis of "mild cognitive impairment" and dementia according to ICD-10 and DSM-III-R criteria." *Int Psychogeriatr* 4 Suppl 2: 203-19.
- Zaudig, M., J. Mittelhammer, et al. (1991). "SIDAM--A structured interview for the diagnosis of dementia of the Alzheimer type, multi-infarct dementia and dementias of other aetiology according to ICD-10 and DSM-III-R." *Psychol Med* 21(1): 225-36.
- Zhong, Q., C. F. Chen, et al. (1999). "Association of BRCA1 with the hRad50-hMre11-p95 complex and the DNA damage response." *Science* 285(5428): 747-50.
- Zhou, B. B. and S. J. Elledge (2000). "The DNA damage response: putting checkpoints in perspective." *Nature* 408(6811): 433-9.
- Zou, L., D. Cortez, et al. (2002). "Regulation of ATR substrate selection by Rad17-dependent loading of Rad9 complexes onto chromatin." *Genes Dev* 16(2): 198-208.

## **ANEXOS**

---

**Hospital das Clínicas – HCFMRP/USP**  
**Divisão de Clínica Médica e Geriatria**

Mini-exame do Estado Mental (MEEM)

N/Ref.: \_\_\_\_\_

Nome do paciente: \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Cidade: \_\_\_\_\_

Escolaridade: \_\_\_\_\_

**ORIENTAÇÃO**

5 ( ) ano – mês – dia do mês – dia da semana – hora aproximada

5 ( ) estado – cidade – bairro – local – andar

**REGISTRO**

3 ( ) pente – vaso – laranja

Tentativas: .....

**ATENÇÃO E CÁLCULO**

5 ( ) seriado descendente de 7: 93, 86, 79, 72, 65 **ou** soletrar a palavra “mundo” de trás para frente.

**EVOCAÇÃO**

3 ( ) repetir as três palavras dadas para registro.

**LINGUAGEM**

9 ( ) - denominar um relógio de pulso e uma caneta

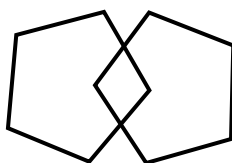
- repetir “nem aqui, nem ali, nem lá”

- atender ao comando 3 estágios: “Pegue o papel com a mão direita, dobre-o ao meio e ponha-o sobre o chão”

- ler e obedecer: FECHÉ OS OLHOS

- escrever uma frase: \_\_\_\_\_

- copiar o desenho



Score total: ..... (máx. 30)

**ESCALA DE DEPRESSÃO EM GERIATRIA**

*Escolha a melhor resposta de como se na última semana*

1. A senhora está satisfeita com a sua vida?  
Sim (N) Não (D)
2. A senhora diminuiu a maior parte de suas atividades e interesses?  
Sim (D) Não (N)
3. A senhora sente que a vida está vazia?  
Sim (D) Não (N)
4. A senhora geralmente se sente aborrecida?  
Sim (D) Não (N)
5. A senhora se sente animada a maior parte do tempo?  
Sim (N) Não (D)
6. A senhora tem medo que algo ruim possa lhe acontecer?  
Sim (D) Não (N)
7. A senhora se sente feliz a maior parte do tempo?  
Sim (N) Não (D)
8. A senhora se sente freqüentemente desamparada?  
Sim (D) Não (N)
9. A senhora prefere ficar em casa a sair e fazer coisas novas?  
Sim (D) Não (N)
10. A senhora acha que tem mais problemas de memória que a maioria das pessoas?  
Sim (D) Não (N)
11. A senhora acha que é bom estar viva?  
Sim (N) Não (D)
12. A senhora se sente inútil ou incapaz do jeito que está agora?  
Sim (D) Não (N)
13. A senhora se sente cheia de energia?  
Sim (N) Não (D)
14. A senhora se sente desesperançosa?  
Sim (D) Não (N)
15. A senhora acha que a maioria das pessoas é melhor que a senhora?  
Sim (D) Não (N)

**D** = deprimida      **N** = normal

Total (contar as respostas D): \_\_\_\_\_

## Hospital das Clínicas – HCFMRP/USP Setor de Geriatria

### Formulário de triagem dos pacientes

N/Ref.: \_\_\_\_\_

Nome do paciente: \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Cidade: \_\_\_\_\_


Escolaridade: \_\_\_\_\_

Nome do acompanhante: \_\_\_\_\_

Já sofreu algum acidente vascular cerebral (derrame)?  Sim  Não

O paciente é diabético?  Sim  Não

Fumante?  Sim  Não (mínimo 6 meses)

<b>MINI-EXAME DO ESTADO MENTAL</b>	Pt
1. Orientação temporal (0-5): ANO – MÊS – DIA – DIA DA SEMANA – HORA 2. Orientação espacial (0-5): ESTADO – RUA - CIDADE - LOCAL - ANDAR 3. Registro (0-3): nomear: PENTE - RUA – CANETA 4. Cálculo- tirar 7 (0-5): 100-93-86-79-65 5. Evocação (0-3): três palavras anteriores: PENTE – VASO – LARANJA 6. Linguagem 1 (0-2): nomear um RELÓGIO e uma CANETA 7. Linguagem 2 (0-1): repetir: NEM AQUI, NEM ALI, NEM LÁ 8. Linguagem 3 (0-3): siga o comando: Pegue o papel com a mão direita, dobre-o ao meio, coloque-o em cima da mesa. 9. Linguagem 4 (0-1): ler e obedecer: FECHÉ OS OLHOS 10. Linguagem 5 (0-1): escreva uma frase completa ..... 11. Linguagem 6 (0-1): copiar o desenho.	
	
<b>TOTAL</b>	

**MEEM:** \_\_\_\_\_ **CDR:** \_\_\_\_\_ **Relógio:** \_\_\_\_\_

Grau de Alzheimer:  Leve  Moderado  Grave

Medicamentos:  Rivastigmina  Donepezil  Galantamina  Memantina  
 Outros: \_\_\_\_\_

Observações:

---

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**  
**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

Campus Universitário Monte Alegre – Fone: 3633-1000 – Fax: 3633-1144

CEP 14048-900 Ribeirão Preto São Paulo

**Nome da pesquisa:** AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES PROCESSADORES DE DANOS OXIDATIVOS EM PACIENTES COM ALZHEIMER.

**Pesquisador responsável:** Douglas Vinicius Nogueira Perez de Oliveira

**Endereço para contato:** Av. Bandeirantes, 3900; CEP: 14049-900  
Laboratório de Citogenética e Mutagenese, Bloco G  
Departamento de Genética - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto  
Universidade de São Paulo (FMRP/USP).

**Telefone :** (16) 3602-3082

**Termo de Consentimento livre e esclarecido – Controles sadios**

Eu, *Douglas Vinicius Nogueira Perez de Oliveira*, pós-graduando em nível de mestrado, do Departamento de Genética, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, estou realizando um estudo sobre a doença de Alzheimer. Trata-se de uma doença neurodegenerativa, que afeta a memória dos portadores, levando a um estado de total dependência da família. Este estudo tem como finalidade a procura de genes que possam contribuir, ou ser responsáveis pelo desenvolvimento da doença de Alzheimer. Dessa forma, esperamos obter resultados que possam contribuir para o melhor entendimento da doença, embora o presente estudo não deva beneficiar diretamente os participantes.

Para a realização desta pesquisa, é necessária a participação de pessoas que não apresentam a doença de Alzheimer, para podermos comparar os resultados entre os grupos sadios (controle) e doentes (com a doença de Alzheimer). Sendo este o termo de consentimento livre e esclarecido dirigido aos voluntários sadios, o pesquisador declara que não prevê qualquer benefício direto ao voluntário com relação à sua participação no estudo.

Assim, caso concorde em participar da realização da nossa pesquisa, faz-se necessária a coleta de 20mL de sangue periférico (o equivalente a uma seringa de sangue), por punção venosa, que será feita por um profissional habilitado e altamente capacitado nessa atividade. Esclareço ao voluntário os seguintes aspectos:

- a. Não haverá nenhum risco em participar da pesquisa e o voluntário terá a garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros relacionados com a pesquisa;

- b. Será dada a liberdade de retirar o seu consentimento a qualquer momento sem que isso traga prejuízo algum ou qualquer tipo de constrangimento;
- c. Será garantida a segurança de que o voluntário não será identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada com a sua privacidade;
- d. Temos o compromisso de proporcionar informações atualizadas durante o estudo, ainda que esta possa influenciar a vontade do voluntário de continuar autorizando a sua participação;
- e. Todos os exames de sangue serão coletados com total responsabilidade e custo dos pesquisadores. A coleta de sangue será feita com material descartável, sendo necessária apenas uma punção da veia do braço, o que pode, de fato, ser um procedimento desconfortável, mas apenas pela “picada” com a agulha;
- f. Pelo fato desta pesquisa não impor risco à saúde dos voluntários, não haverá a necessidade de conceder remuneração ou ressarcimento aos participantes, mas em casos excepcionais, caso o voluntário se sinta lesado com o procedimento da coleta de sangue, este poderá requerer os seus direitos de acordo com as leis vigentes no país.

Para esclarecer quaisquer dúvidas, telefonar para (16) 3602-3082 ou 3602-3827 e falar com Douglas V.N.P. Oliveira (pós-graduando) ou com a Prof. Elza T. Sakamoto Hojo (orientadora do aluno). Endereço: Departamento de Genética, bloco G, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; Av Bandeirantes 3900, 14040-901 Ribeirão Preto, SP.

---

Douglas V.N.P. Oliveira

---

Eu, \_\_\_\_\_, portador do R.G. \_\_\_\_\_, abaixo assinado, tendo recebido as informações supra citadas, ciente dos meus direitos acima relacionados e diante dos esclarecimentos prestados, concordo em participar da pesquisa na qualidade de voluntário.

Ribeirão Preto, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20 \_\_\_\_.

---

Assinatura do voluntário

---

Assinatura do responsável



**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**  
**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

Campus Universitário Monte Alegre – Fone: 3633-1000 – Fax: 3633-1144

CEP 14048-900 Ribeirão Preto São Paulo

**Nome da pesquisa:** AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES PROCESSADORES DE DANOS OXIDATIVOS EM PACIENTES COM ALZHEIMER.

**Pesquisador responsável:** Douglas Vinicius Nogueira Perez de Oliveira

**Endereço para contato:** Av. Bandeirantes, 3900; CEP: 14049-900  
Laboratório de Citogenética e Mutagênese, Bloco G  
Departamento de Genética - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto  
Universidade de São Paulo (FMRP/USP).

**Telefone :** (16) 3602-3082

**Termo de Consentimento livre e esclarecido - Pacientes**

Eu, *Douglas Vinicius Nogueira Perez de Oliveira*, pós-graduando em nível de mestrado, do Departamento de Genética, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, estou realizando um estudo sobre a doença de Alzheimer. Trata-se de uma doença neurodegenerativa, que afeta a memória dos portadores, levando a um estado de total dependência da família. Este estudo tem como finalidade a procura de genes que possam contribuir, ou ser responsáveis pelo desenvolvimento da doença de Alzheimer. Dessa forma, esperamos obter resultados que possam contribuir para o melhor entendimento da doença, embora o presente estudo não deva beneficiar diretamente os participantes.

Assim, para a realização da nossa pesquisa, faz-se necessária a coleta de 20mL de sangue periférico (o equivalente a uma seringa de sangue), por punção venosa, que será feita somente quando o paciente comparecer ao ambulatório para os exames de seguimento solicitados pelo médico responsável. Desta forma, não será feita nenhuma colheita de sangue em outra ocasião. Esclareço ao paciente e ao responsável pelo mesmo, os seguintes aspectos:

- g. Não haverá nenhum risco em participar da pesquisa e o voluntário terá a garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros relacionados com a pesquisa;
- h. Será dada a liberdade de retirar o seu consentimento a qualquer momento sem que isso traga prejuízo algum;
- i. Será garantida a segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada com a sua privacidade;

- j. Temos o compromisso de proporcionar informações atualizadas durante o estudo, ainda que estas possam influenciar a sua vontade de continuar autorizando a participação;
- k. Todos os exames de sangue serão coletados com total responsabilidade e custo dos pesquisadores. A coleta de sangue será feita com material descartável, sendo necessária apenas uma punção da veia do braço, o que pode, de fato, ser um procedimento desconfortável, mas apenas pela “picada” com a agulha;
- l. Não ocorrerão prejuízos no tratamento clínico instituído neste ambulatório, pois não serão substituídas ou modificadas quaisquer medicações por conta deste estudo;
- m. Pelo fato desta pesquisa não impor risco à saúde dos pacientes, não haverá a necessidade de conceder remuneração ou ressarcimento aos participantes, mas em casos excepcionais, caso o paciente se sinta lesado com o procedimento da coleta de sangue, este poderá requerer os seus direitos de acordo com as leis vigentes no país.

Para esclarecer quaisquer dúvidas, telefonar para (16) 3602-3082 ou 3602-3827 e falar com Douglas V.N.P. Oliveira (pós-graduando) ou com a Prof. Elza T. Sakamoto Hojo (orientadora do aluno). Endereço: Departamento de Genética, bloco G, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; Av Bandeirantes 3900, 14040-901 Ribeirão Preto, SP.

---

Douglas V.N.P. Oliveira

---

Eu, \_\_\_\_\_, portador do R.G. \_\_\_\_\_, abaixo assinado, tendo recebido as informações supra citadas, ciente dos meus direitos acima relacionados e diante dos esclarecimentos prestados, concordo em participar da pesquisa na qualidade de voluntário.

Ribeirão Preto, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20 \_\_\_\_.

---

Assinatura do voluntário

---

Assinatura do responsável

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)