UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Genética

Giovana da Silva Leandro

**Alterações na cinética de reparo do DNA e nos perfis de
expressão de genes de resposta ao estresse em
linfócitos de portadores da Doença de Alzheimer**

Ribeirão Preto
2011

Giovana da Silva Leandro

Alterações na cinética de reparo do DNA e nos perfis de expressão de genes de resposta ao estresse em linfócitos de portadores da Doença de Alzheimer

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

Orientadora: **Elza Tiemi Sakamoto Hojo**

Ribeirão Preto

2011

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Leandro, Giovana da Silva

Alterações na cinética de reparo do DNA e nos perfis de expressão de genes de resposta ao estresse em linfócitos de portadores da Doença de Alzheimer– Ribeirão Preto, 2011.

74 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Genética.

Orientadora: Hojo, Elza Tiemi Sakamoto.

1. Danos no DNA. 2. Estresse oxidativo. 3. Doença de Alzheimer.
4. Envelhecimento.

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
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES
(Bolsa de mestrado – março/2009 a novembro/2010)
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
(Bolsa de mestrado – dezembro/2010 a fevereiro/2011)
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP – USP)
- Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FFCLRP – USP)

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, Isabel e Geraldo por estarem sempre presentes na minha vida e por não medirem esforços para a minha felicidade.

São minha referência.

AGRADECIMENTOS

À **Profª. Drª. Elza Tiemi Sakamoto Hojo** pela orientação deste trabalho e por ter proporcionado as condições para o desenvolvimento da pesquisa. Agradeço por toda atenção dedicada, por ter contribuído para minha formação tanto no campo profissional quanto pessoal.

À **Profª. Drª. Catarina Satie Takahashi** por todo o incentivo e apoio e pelos momentos de descontração.

Ao **Prof. Dr. Ademilson Espencer E. Soares** (coordenador do programa de pós-graduação), por ser tão atencioso e estar sempre disposto a resolver os problemas dos alunos.

Ao **Prof. Dr. Julio C. Moriguti**, por permitir a coleta das amostras dos pacientes em seu ambulatório, por ser sempre tão gentil e prestativo, um exemplo de profissionalismo e dedicação.

Às **Profª. Drª. Zilá Luiz Paulino Simões e Márcia Bitondi**, por gentilmente cederem o uso de alguns aparelhos de seu laboratório.

Ao **Dr. Rômulo R. Lobo**, pela parceria de sucesso, pela atenção, paciência e companheirismo dedicados durante esse trabalho. Muito obrigada pelo apoio, pelos ensinamentos valiosos e por confiar no meu trabalho.

Ao **Dr. Silvio Bernardes**, por ter sido sempre tão atencioso e disponível durante nosso período de convivência, pelo exemplo de profissionalismo e dedicação, por ser um exímio coletor de sangue e pela companhia sempre agradável. Obrigada por tudo.

À todos os **médicos dos ambulatórios da geriatria** do HC/FMRP-USP e aos residentes que passaram por lá enquanto eu fazia as coletas, pela paciência e cordialidade. Em especial aos **Dr. Eduardo Borges, Marcelo Mendonça e Edgar**, que sempre foram muito prestativos e atenciosos comigo.

Às secretárias do Departamento de Genética, especialmente à **Susie** e à **Sílvia**, pela disponibilidade e eficiência.

Aos membros da **banca examinadora** por terem aceitado participar da avaliação deste trabalho, contribuindo para sua melhoria.

Aos alunos do bloco A, especialmente à **Aline** e à **Tita**, que sempre estiveram dispostas a colocar minhas reações e chegaram até a aprender a disposição das minhas placas. E também à **Flávia Freitas**, uma grande amiga que me acolheu nos mais variados momentos, disposta a ouvir e ajudar, sempre com uma sagacidade e inteligência incomparáveis.

À **Nalu** e ao **Tiago** do laboratório de Genética e Biologia Molecular de Fungos pela atenção e paciência ao ajudar na padronização da técnica de qRT-PCR em tempo real.

A todos meus companheiros de laboratório que proporcionaram sempre boas horas de convívio, importantes discussões acadêmicas e momentos incríveis de descontração.

À **Ana Paula**, por ser tão prestativa e pela agilidade em resolver qualquer tipo de problema. Ao **Danilo (Xitão)** pela pessoa especial que sempre foi e por ser um grande amigo, que desde os tempos de iniciação científica tem me ensinado muito e acreditado no meu potencial, mesmo quando nem eu mesma acredito. Ao **Felipe (Magal)** pelas imitações nos momentos de descontração e pela prestatividade. À **Fernanda Caetano**, sempre tão agradável e atenciosa. À prestativa **Fernanda Carvalho** que me ajudou nas coletas de sangue. Ao **Gustavo (Polvilho)** pela amizade e pelos momentos de descontração. Ao **Léo** pelas piadinhas infames que sempre geram boas risadas e pela companhia agradável. À **Pati**, sempre tão serena e atenciosa. Ao **Paulo (Cop)** por me ajudar grandemente nesse trabalho, por ter sido um amigo para todo tipo de situação, pela pessoa especial que se tornou ao longo desses anos e pelo ser humano doce e atencioso escondido atrás da cara marrenta. À florzinha amarela **Paulinha** pela grande amiga que se tornou em pouco tempo, por sempre estar disposta a me ajudar nas correções, pelas muitas idéias erradas que divide comigo e pela companhia essencial em muitas ocasiões. À **Raquel**, pelos ótimos conselhos, pela atenção com meus dados do cometa e por sempre ter um lindo sorriso para me receber. Ao **Tiago** e sua paciência sem fim comigo! À minha druga **Flavinha** por ter sido sempre uma grande companheira, pelas gargalhadas que ela consegue arrancar das pessoas com facilidade, por ser sempre esse serzinho tão peculiar, pelas angústias e lágrimas divididas e pelas alegrias somadas. Obrigada pela mão amiga nos momentos de desespero e pela felicidade que você irradia.

Aos amigos e ex-companheiros de laboratório **Douglas, Danillo (Bollor)**. O Douglas por ter me deixado esse trabalho como herança e me acompanhado mesmo

de longe e pelo amigo especial que sempre foi. E o Bollor que foi bastante prestativo durante todos esses anos, sempre oferecendo ajuda nos momentos inusitados.

À **Vera**, que cuida com muito zelo da limpeza do laboratório e é sempre muito prestativa.

Ao **Júnior (Juquinha)** e **Sueli**, pelo suporte técnico dado com carinho, e pelos ótimos momentos de descontração.

Às minhas irmãs da Terra do Nunca, **Bruninha**, **Carlinha**, **Carol**, **Flavinha**, **Gra** e **Pri**, por propiciarem à nossa casa sempre um clima aconchegante, por estarem ao meu lado nos mais variados momentos da vida, por me fazerem companhia no laboratório nos experimentos de domingo à noite, por me agüentarem quando eu mesma já não conseguia e por buscarem entender genética, mesmo não gostando, só para me ajudar. E claro, aos nossos queridos agregados **Frank** e **Michel**.

Aos queridos amigos da 41ª turma de biologia FFCLRP-USP, em especial aos meus grandes amigos **Ricardo (Lumbriga)** e **Leonardo (Léo)** por toda amizade, carinho e compreensão nos momentos difíceis, por serem respectivamente minha voz da razão e da emoção.

Ao **Bruno** que sempre foi muito mais que meu irmão, é meu maior amigo, meu companheiro em todas as etapas da vida. Obrigada pelas companhias no laboratório durante as madrugadas e por ser tão especial.

A toda minha família, que sempre me apoiou e esteve ao meu lado, mesmo nos momentos mais difíceis. Agradeço especialmente aos meus pais **Isabel** e **Geraldo**, sem os quais não teria conseguido chegar até aqui! Obrigada por me aturar, ouvir, compreender, direcionar e por acreditarem em mim sempre! E também aos meus tios **Baly** e **Nice** e minha avó **Nina** que comemoraram e sofreram comigo cada etapa alcançada.

Agradeço, por fim, a todas as pessoas que doaram sangue para o meu trabalho pelo esforço e compreensão sem os quais esta pesquisa não existiria.

RESUMO

A Doença de Alzheimer (DA) é uma demência senil neurodegenerativa crônica, que causa um grande impacto na saúde pública. Apesar de o estresse oxidativo ter sido largamente associado ao processo de envelhecimento e à patogênese das doenças neurodegenerativas (incluindo DA), a literatura sobre o papel do estresse oxidativo no desenvolvimento da DA ainda é escassa assim como para seus fatores de risco. O presente trabalho teve o objetivo avaliar se os linfócitos de pacientes com DA apresentam alterações nos níveis de expressão de alguns genes associados às respostas ao estresse, tais como *SOD1*, *TP53*, *ATM*, *ATR*, *FEN1*, *FANCG*, *CDKN1A* e *MTH1*; além de *ADAM10* e *ADAM17*, associados diretamente à patologia. Além disso, foi proposto também avaliar os níveis de danos no DNA e a cinética de reparo dos linfócitos desses indivíduos quando tratados com peróxido de hidrogênio (H_2O_2), um agente indutor de danos no DNA. As amostras de sangue foram coletadas de pacientes com DA (idade entre 65 a 80 anos) e indivíduos idosos de mesma idade para analisar a expressão gênica e proteica por *Western blot* (n=6) e a expressão transcricional por PCR quantitativa em tempo real (n=7). O ensaio cometa foi realizado para analisar os danos no DNA e a cinética de reparo em linfócitos de pacientes com DA (n=8), indivíduos idosos de mesma idade (n=8) e jovens saudáveis (n=5; faixa etária entre 18 e 28 anos), cultivados por 48h e tratados com H_2O_2 por 1h, e analisados em diferentes tempos de recuperação: 0; 0,5; 2 e 6 horas. A análise da expressão gênica por PCR em tempo real mostrou que o gene *FANCG*, cuja função está relacionada ao controle do ciclo celular e ao reparo do DNA, estava induzido em portadores de DA; o gene *CDKN1A*, envolvido na resposta a danos no DNA, também se apresentou induzido em portadores de DA. No entanto, não foram observadas alterações com diferenças significativas nos perfis transcricionais dos genes *ATM*, *ATR*, *FEN1* e *MTH1* entre portadores de DA e controles. Em relação às proteínas analisadas, foi observada uma sutil diminuição nos níveis da *SOD1* em DA, mas não houve diferenças para *ADAM10* e *ADAM17*. Além disso, observou-se um aumento da expressão da proteína *TP53*, enquanto a análise da forma fosforilada (serina 15) apresentou baixos níveis de indução. Esses resultados são compatíveis com a ausência de diferença nos níveis de expressão dos genes *ATM* e *ATR*. Em relação à análise de indução de danos no DNA e à cinética de reparo, os resultados mostraram diferenças significativas entre os portadores de DA e os controles, o que pode sugerir que os mecanismos envolvidos no processamento do dano oxidativo são diferentes na patologia de Alzheimer quando comparados ao processo de envelhecimento *per se*. Finalmente, os resultados obtidos sustentam a hipótese de que as vias de reparo do DNA podem estar comprometidas na DA. Além disso, foi mostrado que linfócitos do sangue periférico humano podem refletir pelo menos algumas das alterações associadas à doença, o que incentiva maiores investigações nessas células que possam fornecer biomarcadores com potencial para contribuir na caracterização da DA.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder that causes a high impact on public health. Although oxidative stress has been associated with the aging process and the pathogenesis of neurodegenerative diseases (including AD), the literature is still scarce regarding the risk factors for the disease and the role of oxidative damage in the development of AD. The purpose of the present work was to study whether lymphocytes of AD patients display alterations in the expression levels of several genes related to stress responses, such as *SOD1*, *TP53*, *ATM*, *ATR*, *FEN1*, *FANCG*, *CDKN1A*, *MTH1*; and the genes *ADAM10* and *ADAM17* directly associated with the pathology. In addition, our objective was to evaluate the levels of DNA damage and repair kinetics in lymphocytes treated with hydrogen peroxide (H_2O_2). Blood samples were collected from AD patients (age between 65 and 80 years) and elderly individuals in order to analyze protein expression by Western blot (n=6) and transcript expression by quantitative real time PCR (n=7). The comet assay was used to investigate DNA damage and repair kinetics in lymphocytes of AD patients (n=8), elderly age-matched individuals (n=8), and young healthy individuals (n=5; age between 18 and 28 years). In order to accomplish that, lymphocytes were cultured for 47h, treated with H_2O_2 for 1h, and analyzed at different recovery times: 0, 0.5, 2, and 6h. The analysis of gene expression by real time qPCR showed that *FANCG* (implicated in cell cycle control and DNA repair) and *CDKN1A* (involved in the response to DNA damage stimulus) were both up-regulated in AD patients when compared to controls. In contrast, alteration in transcript profiles of *ATM*, *ATR*, *FEN1*, and *MTH1* genes were not significantly different between groups of patients and controls. A small decrease in SOD1 protein levels was detected in AD patients; but, the proteins ADAM10 and ADAM17 expression levels was not different. Moreover, the expression of TP53 was increased in AD patients, while only low levels of TP53-phospho-Ser15 could be found; the latter is consistent with the fact that alterations in the expression levels of *ATM* and *ATR* were not observed. Regarding the analysis of DNA damage and repair kinetics, results showed significant differences between AD patients and controls, suggesting that the mechanisms involved in the oxidative DNA damage processing are different in the pathology of Alzheimer's disease compared to the process of aging itself. Therefore, the results of the present study support our hypothesis that repair pathways may be compromised in AD. In addition, we showed that peripheral lymphocytes may reflect at least some alterations associated to the disease, encouraging further investigation to search for biomarkers present in these cells that might characterize AD.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Envelhecimento e Doenças neurodegenerativas.....	13
1.2 A Doença de Alzheimer	15
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo Geral	19
2.2 Objetivos específicos	19
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1 Grupo de pacientes.....	20
3.2 Cultivo de células e tratamento.....	21
3.3 Ensaio Cometa.....	21
3.3.1 Viabilidade celular	21
3.3.2 Ensaio cometa alcalino.....	22
3.3.3 Tratamento com enzima hOGG1	23
3.4 Avaliação da expressão gênica transcricional por PCR quantitativa em tempo real ...	23
3.4.1 RT-PCR	23
3.4.2 Desenho de iniciadores (primers) e padronização	24
3.4.3 Montagem da reação.....	26
3.4.4 Análise dos resultados	27
3.5 <i>Western blot</i>	28
3.5.1 Extração de proteínas	28
3.5.2 Eletroforese de proteínas	28
3.5.3 Transferência eletroforética.....	28
3.5.4 Imunodeteção e visualização das proteínas.....	28
3.5.5 Anticorpos.....	29
3.5.6 Quantificação das imagens e análise estatística.....	29
4 RESULTADOS	30
4.1 Avaliação de sensibilidade e dinâmica de reparo dos danos no DNA por meio do Ensaio cometa	30
4.2 Expressão gênica transcricional (qRT-PCR)	34
4.3 Expressão gênica traducional (Western blot)	37

5 DISCUSSÃO	39
5.1 Danos no DNA e cinética de reparo.....	39
5.2 Regulação da expressão gênica.....	44
 6 CONCLUSÕES	 54
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 55
 ANEXOS.....	 70

1 INTRODUÇÃO

A manutenção da estabilidade genômica é de importância vital para todos os seres vivos. No entanto, o material genético está sujeito à contínua exposição a agentes endógenos e exógenos que podem modificar a integridade química do DNA e, consequentemente, alterar as informações nele contidas, gerando instabilidade genômica (Pages and Fuchs 2002). Entre os processos que geram a instabilidade está o estresse oxidativo, que resulta da falta de equilíbrio entre a geração de radicais livres e a eficácia dos mecanismos de defesa antioxidante existentes na célula (Saha, Adak et al. 2005).

Radicais livres podem ser definidos como moléculas ou fragmento de moléculas com um ou mais elétrons não pareados em seus orbitais atômicos ou moleculares. Esses elétrons não-pareados geralmente conferem um considerável grau de reatividade ao radical livre (Halliwell and Gutteridge 1988; Miller, Buettner et al. 1990)

Os radicais derivados do oxigênio, também conhecidos por espécies reativas de oxigênio (ROS: *reactive oxygen species*), representam a classe mais importante de radicais livres nos seres vivos (Miller, Buettner et al. 1990). Em condições normais, 2 a 5% do oxigênio consumido pelas mitocôndrias é convertido em ROS (de Zwart, Meerman et al. 1999). Porém, também pode haver a produção de ROS por fontes exógenas, tais como compostos químicos e radiações ionizantes (Halliwell and Gutteridge 1988).

Altas concentrações de ROS podem ser importantes mediadores de danos em componentes celulares, danificando carboidratos, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (Valko, Leibfritz et al. 2007). Além disso, em condições de desequilíbrio, as células podem não responder adequadamente quanto à ativação dos mecanismos de defesa antioxidante, ficando assim expostas aos efeitos deletérios do estresse oxidativo (Nuttall, Dunne et al. 1999).

O dano oxidativo provocado pelos radicais livres no DNA pode ocorrer de diversas formas, como pela oxidação específica de bases ou quebras na fita. Em mamíferos, por exemplo, há mais de 100 tipos de modificações de bases por oxidação no DNA (Dizdaroglu 1991; Croteau and Bohr 1997).

Todas as bases nitrogenadas são suscetíveis à oxidação, com várias modificações já documentadas (Bjelland and Seeborg 2003). No entanto, as mais estudadas são a 8-hidroxi guanosina (8-oxoG) e a timina glicol (TG), que são encontradas de forma abundante em resposta ao estresse oxidativo e são bastante estáveis. As formas oxidadas da timina foram as primeiras a serem identificadas no DNA e entre elas, a TG pode trazer várias consequências para a estabilidade da célula se não for corretamente removida do DNA, devido ao fato de que ela pode causar um forte bloqueio na duplicação da molécula e também na transcrição (Hatahet, Purmal et al. 1994). A 8-oxoG é a mais abundante e caracterizada lesão no DNA ocasionada por ROS. Estima-se que por dia, aproximadamente

180 guaninas/célula são oxidadas para a forma 8-oxoG em mamíferos, sendo esta uma lesão crítica que gera tranversões G: C para T:A (Grollman and Moriya 1993; Lindahl 1993).

As células expostas à ação de espécies reativas possuem uma série de mecanismos capazes de protegê-las de seus efeitos deletérios. A primeira resposta celular é mediada por enzimas antioxidantes, como a superóxido desmutase, a catalase e a glutathione redutase. Quando há oxidação de alguma base, algumas enzimas que hidrolisam dNTPs oxidados também podem atuar, como a 8-oxoGTP, que elimina a base oxidada antes que essa seja incorporada ao DNA. Ainda assim, se esta primeira etapa falhar, a célula ativarão mecanismos responsáveis pelo reparo da molécula danificada, na tentativa de remover o dano do material genético. Em células de mamíferos, esses mecanismos incluem: reparo por excisão de bases (BER, *base excision repair*), reparo por excisão de nucleotídeos (NER, *nucleotide excision repair*), reparo de bases mal pareadas (MMR, *mismatch repair*), além do reparo por recombinação homóloga (HRR) e por união de extremidades não homólogas (NHEJ) (Bjelland and Seeberg 2003; Sancar and Reardon 2004). Especificamente, o reparo do DNA contendo bases oxidadas é processado predominantemente por BER (Ni, Marsischky et al. 1999; Mitra, Boldogh et al. 2001; Wallace 2002).

Com base em todos os mecanismos envolvendo a ação dos radicais livres e os danos que estes causam ao DNA, o ideal para os organismos é um equilíbrio homeostático entre a geração e a eliminação de ROS, pois além do seu importante papel na indução de estresse oxidativo, as ROS destacam-se por participar da regulação e sinalização intracelular, atuando, por exemplo, na ativação de fatores de transcrição que controlam a expressão de genes de reparo, proliferação celular, apoptose e o sistema imune (Droge 2002).

O desequilíbrio homeostático gerado pelo estresse oxidativo pode gerar uma instabilidade genômica e, conseqüentemente, modificações permanentes no material genético, contribuindo para os processos de mutagênese, carcinogênese e envelhecimento (Teebor, Boorstein et al. 1988).

1.1 Envelhecimento e Doenças neurodegenerativas

De acordo com Harman (1981), o envelhecimento é um processo comum a todos os seres vivos no qual ocorre acúmulo progressivo de mudanças que acompanham o avanço da idade e podem estar associadas ou serem responsáveis pelo aumento da suscetibilidade a doenças ou a morte. Algumas manifestações tanto do envelhecimento quanto das suas taxas de avanço estão sob controle genético, apesar de haver grande influência de fatores ambientais.

Harman postulou ainda uma teoria denominada "*Free radical theory of aging*". Esta sugere que o acúmulo de dano oxidativo não-reparado está relacionado à senescência celular e associado à deterioração relacionada à idade (Harman 1956). Atualmente, muitas

outras evidências suportam o papel do dano oxidativo no processo de envelhecimento (Golden, Hinerfeld et al. 2002; Bokov, Chaudhuri et al. 2004; Balaban, Nemoto et al. 2005). Dessa forma, assim como existe uma forte relação entre o tamanho do telômero e a idade replicativa da célula, há dados que apontam para a possibilidade de que a quantidade de danos no DNA também esteja diretamente relacionada à idade da célula (Harley, Futcher et al. 1990; Hastie, Dempster et al. 1990; Parrinello, Samper et al. 2003).

Os mecanismos de BER são fundamentais no reparo de danos causados pelo estresse oxidativo, que pode ser considerado o principal fator causador de envelhecimento. No entanto, o exato papel desse mecanismo na senescência celular e no envelhecimento ainda não pode ser avaliado, e essa dificuldade em testar esse mecanismo deve-se ao fato que a deleção dos genes essenciais para BER resultam em letalidade embrionária. Assim, os mecanismos de reparo do DNA são responsáveis por prevenir a senescência celular, o envelhecimento prematuro e doenças relacionadas a esses processos, através da manutenção da estabilidade genômica (Lou and Chen 2006).

Em geral, os portadores de doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer (DA), apresentam danos no DNA dos neurônios, sendo estes associados ao aumento na produção de ROS, à disfunção mitocondrial e à desregulação na homeostase celular do cálcio (Yang, Weissman et al. 2008). O estresse oxidativo causado pelos processos específicos da doença, o acúmulo de proteínas patogênicas, assim como o processo de envelhecimento em si, contribuem para a disfunção mitocondrial e para a instabilidade genômica nas doenças neurodegenerativas (Yang, Weissman et al. 2008). Além disso, os mecanismos de reparo do DNA, especialmente BER, podem influenciar diretamente a patogênese, uma vez que sua deficiência é reconhecida como o principal causador de perda neuronal (Yang, Weissman et al. 2008).

Vários processos ativados pelas ROS podem induzir o re-ingresso dos neurônios no ciclo celular. Ainda que exista uma grande correlação entre injúrias no DNA causado pelo aumento da produção de ROS e uma parada no ciclo celular (Migliore and Coppede 2002), algumas células, dependendo do estágio em que se encontram, podem iniciar um processo de re-entrada no ciclo celular, a qual geralmente é anormal e culmina na indução de apoptose. Células que se encontram nas fases G1, G2/M, quando sob estresse oxidativo, geralmente iniciam uma série de processos que levam ao bloqueio do ciclo celular, ao contrário daquelas quiescentes (G0), que são sinalizadas para apoptose após uma re-entrada aberrante no ciclo (Chen and Yang 2000; Klein and Ackerman 2003). Apesar de ainda não serem bem estabelecidas, várias vias podem estar relacionadas a esse processo, dentre eles postula-se injúrias no DNA e proteínas, além do remodelamento da cromatina através da diminuição da atividade das acetilases de histonas, liberando os fatores de transcrição (Klein and Ackerman 2003).

Por outro lado, grandes quantidades de ROS podem iniciar uma série de eventos que levam ao acúmulo de proteínas dentro dos neurônios, como observado em pacientes com Parkinson e Alzheimer. Normalmente para que sejam funcionalmente ativas, as proteínas passam por um processo de dobramento para a constituição da sua forma terciária, processo realizado pelas chaperonas, que atuam em polipeptídeos recém formados, impedindo a agregação dos mesmos e auxiliando no seu correto dobramento (Outeiro and Tetzlaff 2007). Vários processos podem levar a proteínas mal dobradas, ou erroneamente dobradas, tais como altas temperaturas, a presença de certos compostos químicos, ou mesmo erros durante a sua síntese, resultando na perda da função das mesmas, podendo levar à formação de aglomerados. As células respondem a essas situações com a ativação da resposta *Heat Shock*, ou resposta ao estresse, produzindo grandes quantidades de proteínas chaperonas (também chamadas de proteínas *Heat Shock*) (Lindquist and Craig 1988), bem como outras proteínas de resposta a estresse ou relacionadas ao mesmo.

As proteínas que não se encontram devidamente dobradas, ou apresentam algum defeito, seguem um de dois caminhos: ou são reparadas pelas chaperonas ou sinalizadas para destruição. Uma via de maior importância na degradação destas proteínas é o sistema Ubiquitina-Proteassoma (UPP), que quebra as proteínas mal-formadas em aminoácidos, evitando o acúmulo das mesmas dentro das células (Glickman and Ciechanover 2002).

Sendo assim, quando algum dos componentes deste sistema encontra-se ausente, ou inativo, um grande número de proteínas se acumula nas células, como observado em algumas doenças neurodegenerativas, como Parkinson e Alzheimer. Falhas nesta via pode ocorrer devido a vários fatores de exposição, como radiações ionizantes (Pervan, Iwamoto et al. 2005), estresse oxidativo (Reinheckel, Sitte et al. 1998), drogas quimioterápicas (McDougal and Jurgens-Whitehead 2001), dentre outros.

1.2 A Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA) foi descrita pela primeira vez por Alois Alzheimer em 1907 e atualmente é a forma mais comum de demência. Caracterizada como uma demência senil, neurodegenerativa crônica, cujo principal risco é a idade, esta doença tem um grande impacto na saúde pública sendo que sua incidência tem aumentado com a crescente expectativa de vida da população (Sramek and Cutler 1999; Avramopoulos 2009).

A caracterização histológica da DA consiste na alteração do citoesqueleto neurológico que se contorce em estruturas denominadas emaranhados neurofibrilares (ENF) e, fora da célula, os peptídeos amilóide β ($A\beta$) 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 amiloide cerebrais tomam formas delimitadas de placas (Nicoll, Roberts et al. 1996; Kim, Lee et al. 2002; Li, Lindholm et al. 2004).

Os peptídeos amiloide β ($A\beta$) são produtos naturais do metabolismo consistindo de 36 a 43 aminoácidos. Os monômeros de $A\beta_{40}$ são muito mais prevalentes que $A\beta_{42}$, uma forma propensa à agregação e causadora de danos. Os peptídeos $A\beta$ originam-se da proteólise da Proteína Precursora de Amiloide (APP) por uma sequência de ações enzimáticas. A $A\beta$ é clivada a partir de APP primeiro pela β -secretase e então pela γ -secretase. Entretanto, a formação de $A\beta$ é de ocorrência relativamente rara em cérebro de indivíduos normais; normalmente APP é clivada primeiro pela α -secretase, ao invés da β -secretase, inibindo a produção de $A\beta$ (Figura 1.1). A enzima responsável pela maior parte da clivagem de β -secretase é uma proteinase integral de membrana, conhecida como enzima de clivagem β -secretase (BACE). As identidades das α -secretases também são conhecidas, a ADAM10 (uma desintegrina e metaloproteinase) (Lammich, Kojro et al. 1999) e a ADAM17, também conhecida como enzima conversora de fator de necrose tumoral (TACE) (Buxbaum, Liu et al. 1998), ambas capazes de clivar APP no sítio de clivagem da α -secretase (Hotoda, Koike et al. 2002).

Figura 1.1: Esquema representativo da degradação da proteína transmembrana APP, mostrando as vias amiloidogênica (em que ocorre a formação de $A\beta$); e a via não amiloidogênica (em que a APP é degradada em peptídeos solúveis). A figura foi modificada de Avramopoulos (2009).

Atualmente, os portadores da DA podem ser divididos entre os que apresentam a doença precocemente, sendo esta decorrente de um fator hereditário autossômico dominante, e aqueles que apresentam uma forma de DA denominada esporádica, cujos fatores hereditários parecem também estar presentes, porém, de uma maneira bem mais complexa e que merece melhor investigação (Avramopoulos 2009).

Para a forma precoce da doença já foram descritos três genes que podem estar implicados no desenvolvimento da patologia, sendo eles: *APP*, *PSEN1* e *PSEN2* (Goate, Chartier-Harlin et al. 1991; Haines 1991; Tanzi, Gaston et al. 1993; Levy-Lahad, Wijsman et al. 1995; Sherrington, Rogaev et al. 1995). Esses genes têm papel importante nos processos de deposição de A β . No entanto, 95% dos casos de DA são esporádicos e não seguem o mesmo tipo de herança mendeliana da forma precoce, apesar de importantes fatores genéticos estarem implicados no desenvolvimento da doença. Foram descobertas variantes do gene *APOE* que têm uma relação importante no aumento das chances do desenvolvimento da DA esporádica, além de uma série de outros genes candidatos (Bergem, Engedal et al. 1997; Gatz, Pedersen et al. 1997; Avramopoulos 2009)

Uma série de outras alterações no organismo estão associadas à DA, tais como: perda neuronal e de massa branca, disfunção mitocondrial, problemas na regulação do cálcio e inflamação (Hirai, Aliev et al. 2001; Wyss-Coray and Mucke 2002; Caspersen, Wang et al. 2005; Isaacs, Senn et al. 2006)

Muitos estudos *in vitro* demonstraram um efeito tóxico direto da A β em culturas de neurônios ou linhagens celulares. Se isso reflete ou não a situação *in vivo* não é conhecido, mas essa informação pode ser importante para explicar o papel do processo amiloidogênico na patogênese da DA. Behl e Sagara (1997) mostraram que essa toxicidade da A β em células PC12 (modelo para o estudo de células nervosas) é suprimida pela vitamina E e por anti-oxidantes em geral. Em outro estudo, o autor demonstrou que o peróxido de hidrogênio é capaz de mediar a ação tóxica da A β , sendo que a catalase, que degrada o peróxido de hidrogênio, protege as células desta toxicidade (Behl, Davis et al. 1994). Esse mesmo grupo selecionou clones de células PC12 resistentes à toxicidade de A β e mostrou que elas continham altas concentrações das enzimas antioxidantes catalase e glutathione peroxidase (Sagara, Dargusch et al. 1996).

A própria β -amilóide constitui uma fonte de radicais livres. Esta interage com células vasculares endoteliais, produzindo um excesso de radicais superóxido livres, o que pode representar um fator importante nos processos neurodegenerativos (Thomas, Thomas et al. 1996).

Muitos estudos sugerem que o aumento de danos no DNA, particularmente dano oxidativo, e a diminuição da atividade de reparo sejam características da DA (Li and Kaminskas 1985; Robison, Munzer et al. 1987). Entre as evidências que sustentam essa hipótese e foram observadas em pacientes com DA destacam-se os altos níveis de 8-oxoG no DNA nuclear e

mitocondrial de regiões cerebrais, o aumento dos marcadores de dano oxidativo no DNA de tecidos periféricos, bem como o aumento dos níveis de deleções e mutações de ponto no DNA mitocondrial (Gabbita, Lovell et al. 1998; Lovell, Gabbita et al. 1999; Kadioglu, Sardas et al. 2004; Migliore, Fontana et al. 2005; Wang, Markesbery et al. 2006).

O acúmulo de evidências em relação a falhas nos mecanismos de reparo do DNA na patologia de DA levou alguns pesquisadores a buscarem procurarem genes, principalmente da via BER de reparo, que possam estar envolvidos no aumento dos riscos ao desenvolvimento da forma esporádica da doença; entretanto, apesar de algumas evidências importantes, não foram ainda encontrados esses supostos polimorfismos (Coppede and Migliore 2009).

Além dos mecanismos de reparo do DNA e processamento do estresse oxidativo que parecem estar comprometidos nas células de portadores de DA, estudos recentes apontam disfunções nos mecanismos responsáveis pela regulação do ciclo celular e detecção dos danos no DNA. Zhou e colaboradores (Zhou and Jia 2010) relataram disfunção na progressão e regulação do ciclo celular em linfócitos de indivíduos com DA quando comparados com indivíduos saudáveis, especificamente na transição G1/S. Encontraram ainda, níveis alterados de expressão e mutações na proteína TP53, o que sugere a existência de anomalias nas vias das quais participam essa proteína, que tem um importante papel na determinação do destino das células com danos no DNA (Inoue, Stuart et al. 2002; Zhou and Jia 2010).

Outra grande incógnita em relação à DA é a ausência de um diagnóstico definitivo. Apesar do diagnóstico clínico da DA ser confiável em mais de 90% dos casos, o diagnóstico definitivo é dado apenas *post mortem*, quando é possível verificar atrofia cerebral e as características histopatológicas da doença, emaranhados neurofibrilares contendo a proteína TAU hiperfosforilada e a deposição extracelular de proteínas A β (Avramopoulos 2009). Dessa forma, permanece a necessidade de buscar marcadores que possibilitem um diagnóstico confiável e precoce da DA.

Tecidos como o sangue são alvos importantes para essa busca, devido ao acesso fácil e pouco invasivo. Apesar da natureza neurodegenerativa da DA, os linfócitos do sangue periférico mostraram-se valiosos para a compreensão desse mal uma vez que estes também refletem alguns dos efeitos dessa patologia e podem apresentar características que permitam um diagnóstico precoce da doença (Zhang and Majerus 1998; Morocz, Kalman et al. 2002).

Assim, considera-se válida a utilização dos linfócitos para avaliar a eficiência dos mecanismos de reparo em indivíduos com DA, buscando correlacionar os níveis de dano oxidativo com o envelhecimento e a patologia, além de buscar a compreensão das alterações nas vias relacionadas ao reparo do DNA na condição patológica. Com isso, tem-se a expectativa de contribuir com informações interessantes sobre o papel do estresse oxidativo na DA.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi analisar a resposta ao estresse oxidativo e a eficiência de reparo do DNA em linfócitos de indivíduos com Doença de Alzheimer, comparando-os com indivíduos saudáveis da mesma faixa etária e indivíduos jovens; além de avaliar a expressão gênica transcricional e proteica de alguns genes envolvidos nas vias de detecção de danos e reparo do DNA em portadores da DA.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o nível de danos e a eficiência de reparo do DNA em linfócitos de indivíduos com DA e idosos de mesma faixa etária e jovens saudáveis tratados por uma hora com peróxido de hidrogênio para a indução de danos e analisados após 0; 0,5; 2; e 6 horas de recuperação, por meio do ensaio cometa convencional e pelo ensaio modificado que emprega a enzima hOGG1 para a detecção de dano oxidativo.
- Comparar os perfis de expressão transcricional dos genes *MTH1*, *FANCG*, *ATM*, *ATR*, *CDKN1A* e *FEN1* em linfócitos de indivíduos com DA e idosos da mesma faixa etária. Os genes estudados têm papel relacionado ao processo de detecção de danos e reparo do DNA.
- Comparar os perfis de expressão das proteínas ADAM10, ADAM17, SOD1, TP53 e TP53 fosforilada na serina 15 em linfócitos de indivíduos com DA e indivíduos idosos da mesma faixa etária. As proteínas ADAM10 e ADAM17 estão envolvidas no processo de clivagem da APP, enquanto a SOD1 é uma enzima antioxidante e a TP53 está implicada no processo de manutenção da estabilidade genômica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Grupo de pacientes

O grupo de pacientes portadores de DA envolveu 14 indivíduos, na faixa etária entre 65 a 80 anos e escolaridade entre um e oito anos. Todos os participantes foram submetidos ao Mini Exame do Estado Mental (MEEM) (Folstein *et al.*, 1975), o teste do relógio e a Escala Clínica de Demência (*Clinical Dementia Rating* – CDR) (Hughes *et al.*, 1982).

Os voluntários apresentaram diagnóstico de DA provável, com base nos critérios propostos pelo DSM-IV (Manual de Diagnóstico e Estatística de Transtornos Mentais) (Association, 1994), DSM-III-R (Idem – 3a Ed revisada) (Association, 1987), NINC-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 selecionados apenas os voluntários com escore isquêmico de Hachinski (Hachinski *et al.*, 1975) abaixo de quatro (valores acima desse limiar referem-se à demência por múltiplos infartos). Todos os 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 médicos especialistas responsáveis da própria instituição – Hospital da Clínicas – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC-FMRP-USP).

Para a composição do grupo controle foram selecionados 13 indivíduos idosos de 65 a 80 anos, os quais não apresentaram queixas de memória no momento da avaliação e eram normais do ponto de vista cognitivo, por meio de avaliação clínica com anamnese detalhada. Outro grupo controle foi constituído por 5 indivíduos na faixa etária de 18 a 28 anos, que são voluntários considerados sadios, não fumantes, não alcoolistas, e que não foram expostos aos tratamentos quimioterápico e/ou radioterápico.

O projeto foi submetido ao comitê de ética local da FMRP, sendo que as amostras foram coletadas somente após a aprovação pelo mesmo. Ao aceitarem participar da pesquisa, os voluntários assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (em anexo).

3.2 Cultivo de células e tratamento

As amostras de sangue de pacientes e controles foram coletadas por meio de tubos Vacutainer (Beckton & Dickson, EUA) de dois tipos, com heparina sódica (de onde foram separados os leucócitos para cultura) e com EDTA (cujos leucócitos estocados foram usados para extração de RNA e proteínas).

Os leucócitos foram separados por centrifugação com Ficoll® (Biochrom KG, Berlin, Germany), uma parte das amostras foi usada para a extração de RNA, DNA e proteínas; o restante das amostras foi utilizado para cultivo de linfócitos e posterior realização do ensaio cometa.

Para o cultivo foram preparadas culturas dessas células em meio RPMI 1640 (10,4g RPMI - Sigma Chemical Co., St. Louis, USA - contendo 0,005 g de penicilina (Sigma), 0,01g de estreptomicina (Inlab) e água q.s.p. 1000ml) suplementado com soro fetal bovino a 20% (Cultilab). Foi utilizado também o agente mitogênico fitohemaglutinina A (Invitrogen Corporation, Grand Island, USA) a 2% para estimular a proliferação dos linfócitos.

O cultivo foi realizado por 48 horas e na última hora os linfócitos foram submetidos a estresse genotóxico pela adição de 80µM de H₂O₂ no meio de cultura, sendo coletadas amostras para o ensaio do cometa nos tempos de 0; 0,5; 2 e 6 horas de recuperação, conforme descrito esquema abaixo.

3.3 Ensaio Cometa

3.3.1 Viabilidade celular

O teste de viabilidade celular com azul de Trypan precedeu a realização do ensaio cometa a fim de assegurar que as culturas analisadas apresentassem células viáveis em quantidade suficiente (70% ou mais), pois células não viáveis podem apresentar dano genômico como consequência de processos como morte celular, por exemplo, e não como consequência direta do tratamento utilizado.

O teste de exclusão por azul de Trypan consistiu em retirar 5µL de suspensão celular e adicionar a 5µL de solução de azul de Trypan 0,4% em uma lâmina de microscopia. As lâminas foram analisadas por microscopia óptica convencional. Foram contadas 100 células por lâmina, sendo que as células inviáveis coram-se em azul e as viáveis não são coradas.

A viabilidade foi calculada em porcentagem, dividindo-se o número de células viáveis pelo total de células contadas. Para a realização ensaio cometa foram consideradas válidas as culturas que apresentaram uma viabilidade superior a 70%.

3.3.2 Ensaio cometa alcalino

O ensaio Cometa foi realizado segundo o protocolo convencional (Singh et al. 1988) adaptado no Laboratório de Citogenética e Mutagênese do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Após a colheita de alíquotas das culturas, as células foram centrifugadas a 1000rpm por 5min, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspendido com auxílio de micropipeta. Foram adicionados 40µL da cultura de linfócitos a um volume de 400µL de agarose de baixo ponto de fusão (37°C) a 0,5%.

Transferiu-se a mistura para quatro lâminas de microscopia recém-preparadas com uma primeira camada de agarose de ponto de fusão normal a 1,5%. Essas lâminas foram cobertas com lamínulas e deixadas a 4°C por 5min. As lamínulas foram retiradas cuidadosamente e as lâminas foram mergulhadas em uma solução de lise recém-preparada (NaCl 2,5M, Na₂EDTA 100µM, Tris 10mM, Triton X-100 1% e DMSO 10%, pH 10,0) e mantidas a 4°C, por pelo menos doze horas.

Transcorrido o tempo necessário na solução de lise, duas das lâminas de cada amostra foram colocadas em uma cuba para eletroforese contendo tampão de pH alcalino (NaOH 0,3M e Na₂EDTA 1mM, pH > 13) durante 20min, após os quais a eletroforese foi processada a 25V (1V/cm, 300mA) a 4°C durante 20min. As outras duas lâminas foram primeiro tratadas com a enzima hOGG1 (descrita com detalhe no próximo item)¹, que será melhor explicado, e depois submetidas à etapa de eletroforese.

Após a eletroforese, as lâminas foram lavadas com tampão de neutralização (Tris-HCl 0,4M, pH 7,5) e foram posteriormente fixadas em etanol absoluto por alguns segundos.

A coloração das lâminas foi feita sempre minutos antes da análise, por meio da adição de 50µL de solução 0,2 µg/mL de SYBR GREEN I (Invitrogen- Eugene, Oregon-USA) sobre esta, que foi coberta com uma lamínula, sendo a análise imediata.

As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência (Zeiss, filtro 516 – 560 nm e barreira de filtro de 590 nm) em aumento de 20X.

Foram analisadas 50 células/tratamento/indivíduo por meio do programa *Comet Assay IV* (Perceptive Instruments Ltd). A análise consistiu na captura de imagens por meio de microscopia de fluorescência, usando-se uma câmera acoplada a um computador. O programa utilizado fornece uma série de dados a partir da imagem escolhida, entre os quais apenas o parâmetro *Tail intensity*, considerado como o mais adequado para o tipo de análise

a ser feita, foi utilizado neste trabalho. Este determina a porcentagem de DNA na cauda do cometa, a qual está diretamente relacionada com a quantidade de danos presentes no DNA da célula em questão. A análise estatística foi realizada usando o *software Sigma Stat 3.5* e foram aplicados os testes estatísticos *Two Way ANOVA* e o teste *t*.

3.3.3 Tratamento com enzima hOGG1

O ensaio cometa, a princípio, detecta quebras na fita de DNA, no entanto, algumas modificações no protocolo permitem a detecção de outros tipos de lesões no material genético, tais como modificações de base, principalmente as lesões provocados por danos oxidativo. Assim, utilizou-se a enzima hOGG1 para incubação das lâminas. Esta é uma endonuclease de reparo capaz de reconhecer certos danos específicos de base, na forma de quebras de fita simples. A enzima hOGG1 é específica para danos oxidativos, sendo uma das glicosilases que compõem o sistema de reparo por excisão de bases, em particular, aqueles que ocorrem na guanina formando a 8-oxoguanina (8-oxoG), que leva à mutação (Klungland and Lindahl 1997; Boiteux and Radicella 2000). Tendo início o reparo, a hOGG1 remove a base danificada, resultando em um sítio apurínico ou apirimidínico, o qual é posteriormente clivado pela própria enzima, que possui a função de AP liase (Zharkov, Rosenquist et al. 2000). Assim, a utilização da hOGG1 no ensaio cometa provoca um aumento na quantidade de danos no material genético, comparativamente ao basal, constituindo uma importante ferramenta para a avaliação de dano oxidativo (8-oxoG).

A enzima hOGG1 foi diluída em tampão F, em diluições de 0,08 unidades por gel. Para o tratamento com a enzima, posteriormente ao processo de lise, já descrito, as lâminas foram lavadas com PBS 1% e 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, à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram tratadas com 50µl da solução de enzima, cobertas por lamínulas e incubadas em uma câmara úmida por 20min a 37°C. Após este tratamento, as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram submetidas às etapas de eletroforese, neutralização e fixação, conforme descrito anteriormente.

3.4 Avaliação da expressão gênica transcricional por PCR quantitativa em tempo real

3.4.1 RT-PCR

Para os experimentos PCR em tempo real a extração de RNA total de todas as culturas celulares foi feita segundo o protocolo do reagente TRIZOL® (Invitrogen, Carlsbad,

CA, USA). As amostras foram quantificadas no espectrofotômetro NanoDrop ND1000 (*NanoDrop Technologies*) nos comprimentos de onda 230nm, 260nm e 280nm. A pureza do RNA foi avaliada pela razão A_{260}/A_{280} , na qual o ideal é obter valores próximos de 2,0 (entre 1,8 e 2,1), demonstrando ausência de contaminação por proteínas e DNA. Também foi avaliada a razão A_{260}/A_{230} , na qual valores inferiores a 1,7 ou superiores a 2,2 demonstram contaminação por compostos orgânicos, tais como o fenol. A integridade do RNA foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose com formaldeído, corado com GelRed (*Biotium*) e visualizado por transiluminador UV.

Para a RT-PCR, foi utilizado o *kit Superscript III Reverse Transcriptase* (Invitrogen); após adicionar 1µL de *oligo DT primer* (250ng/µL) aos RNAs provenientes das amostras da reação com a DNase, as amostras foram incubadas a 70°C, por 10min; ao final, colocadas no gelo. Foram adicionados aos tubos 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 50min, a 50°C e, no final, à uma temperatura de 70°C por 15min. Após esse procedimento, foi realizada a reação de PCR convencional para um gene constitutivo, *B2M*, a fim de testar a integridade das amostras de cDNA.

3.4.2 Desenho de iniciadores (primers) e padronização

Para determinar as sequências dos iniciadores dos genes a serem estudados por PCR quantitativa em tempo real, foi seguido um protocolo desenvolvido no laboratório de Citogenética e Mutagênese do Departamento de genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, conforme descrito a seguir.

Buscou-se, inicialmente, a sequência em formato FASTA do mRNA de cada gene (em humanos) no *site* do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Esta sequência de nucleotídeos foi utilizada como entrada para o programa de alinhamento BLAST para que fosse feito alinhamento da sequência inicial com um banco de dados escolhido (*Celera cWGA Scaffolds*), utilizando-se o algoritmo específico para alinhamento de sequências de nucleotídeos (BLASTN). O programa foi utilizado via *web*, no próprio *site* do NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/BlastGen/BlastGen.cgi?_taxid=9606). Dentre os alinhamentos resultantes, escolheu-se o de menor valor *E*.

Na página do alinhamento são encontradas coordenadas das sequências, *Subject* e *Query*, com as quais foi possível determinar a posição dos éxons no cromossomo. Conhecida a ordem dos éxons no gene e foi possível ainda verificar se houve sobreposição de nucleotídeos nas fronteiras dos éxons adjacentes.

A sequência da região cromossômica do alinhamento escolhido foi salva em formato FASTA e utilizada como entrada no *software Artemis* (versão 11.4.1) (Rutherford *et al.*,

2000). Com o auxílio desse software foi possível determinar com exatidão as fronteiras dos éxons, eliminando as sobreposições por meio da inserção das coordenadas do alinhamento no programa, determinando assim a anotação de cada éxon do gene.

Depois da anotação, as fronteiras éxon-íntron foram ajustadas e dois éxons adjacentes com a maior região intrônica foram selecionados. As sequências desses éxons foram então ligadas para que fosse feito um alinhamento com o genoma humano no BLAST (base de dados *genome (all assemblies)*) para a verificação da especificidade da região escolhida, que deveriam corresponder ao gene de interesse. Com essa verificação e adequação da sequência, esta foi submetida ao programa de desenho de iniciadores *Primer 3* (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). Alguns parâmetros, como temperatura de *melting* e tamanho dos iniciadores, foram especificados. Entre os resultados sugeridos pelo programa, o par de iniciadores escolhido foi aquele em que um dos iniciadores desenhados estava na região de intersecção entre as duas seqüências de éxons, ou, caso não fosse possível, ao menos cada iniciador deveria estar localizado em éxons diferentes. Com isso, fica assegurado que se houver contaminação da amostra com DNA genômico, o par de iniciadores não amplificará essas sequências genômicas.

Os iniciadores escolhidos foram ainda submetidos a alguns testes de especificidade, por meio do alinhamento de suas sequências no BLAST (*Basic BLAST – Nucleotide BLAST* no endereço http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome) além de ser submetido à uma análise em um site específico para teste de iniciadores (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/e-pcr/reverse.cgi?orgdb=0&taxid=&type=table&Unistslist=&margin=50&mism=0&gaps=0>). Os iniciadores com resultados positivos nessas análises foram então escolhidos para serem usados neste trabalho.

Dessa forma, foram desenhados iniciadores para os genes *ATM*, *ATR*, *FANCG*, *FEN1*, *MTH1*, *p21*, além dos genes de referência *B2M*, *GUSB*, *HPRT1* e *TBP* (Tabela 3.1). A confecção dos iniciadores foi realizada pela IDT (*Integrated DNA Technologies*, Coralville, USA).

Tabela 3.1: Iniciadores utilizados para a análise da expressão gênica transcricional pelo método de PCR quantitativa em tempo real.

Iniciador	Sequência	Tamanho do produto (pb)
<i>ATM – forward</i>	5' –GACGTTACATGAGCCAGCAA – 3'	100
<i>ATM – reverse</i>	5' – CACATGCGATGGAAAATGAG – 3'	
<i>ATR – forward</i>	5' – GTGAGTGGAAGCCATGAGG – 3'	109
<i>ATR – reverse</i>	5' –ACAAATGACAGGAGGGAGTTG – 3'	
<i>FEN1 – forward</i>	5' – ATTCCCATGGCAACACAGAG – 3'	112
<i>FEN1 – reverse</i>	5' – AGGGAGAGCGAGCTTAGGAC – 3'	
<i>MTH1 – forward</i>	5' – CGTGGAGAGCGACGAAAT – 3'	103
<i>MTH1 – reverse</i>	5' – CTGAAGCAGGAGTGGAAACC – 3'	
<i>CDKN1A – forward</i>	5' – CTTCTGTGGGCGGATTAG – 3'	105
<i>CDKN1A – reverse</i>	5' – GACTCTCAGGGTCGAAAACG – 3'	
<i>FANCG – forward</i>	5' –GACAGCAGTTGGCTCAGGAT – 3'	102
<i>FANCG – reverse</i>	5' –CAGTCAGCTCCAAGGGAAGA – 3'	
<i>B2M – forward</i>	5' – AGGCTATCCAGCGTACTCCA – 3'	112
<i>B2M – reverse</i>	5' – TCAATGTCGGATGGATGAAA – 3'	
<i>GUSB – forward</i>	5' – CACCAGGATCCACCTCTGAT – 3'	115
<i>GUSB – reverse</i>	5' – TCCAAATGAGCTCTCCAACC – 3'	
<i>HPRT1 – forward</i>	5' – TCATTATGCTGAGGATTTGGA – 3'	104
<i>HPRT1 – reverse</i>	5' – GATGGCCTCCCATCTCCTT – 3'	
<i>TBP – forward</i>	5' – AGGAGCCAAGAGTGAAGAACAG – 3'	117
<i>TBP – reverse</i>	5' – CTCCCCACCATGTTCTGAAT – 3'	

Esses genes de resposta ao estresse oxidativo e os quatro genes de referência foram avaliados quanto à sua expressão transcricional em linfócitos de indivíduos portadores de DA e idosos da mesma faixa etária.

Para a otimização da técnica, foram padronizadas as quantidades de iniciadores e de cDNA, conforme recomendado no protocolo do *kit SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, USA)

Além disso, foram testadas diluições de um pool de cDNA para cada par de iniciadores utilizados, que permitiram a obtenção de uma “curva-padrão”. Essa curva forneceu dados como *Slope* e R^2 , com os quais é possível determinar a eficiência dos iniciadores e a qualidade da reação para os genes em questão.

3.4.3 Montagem da reação

Foi utilizado o *kit SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, USA) para a realização da qPCR em tempo real e as especificações de quantidades

determinadas sugeridas em seu protocolo foram seguidas. As reações foram feitas com o volume de 12,5 µL. O volume total da reação foi composto por 6,25 µL de *SYBR Green PCR Master Mix*, 1 µL do *primer forward* e 1 µL do *primer reverse* (ambos com solução estoque de 10 µM), 3,25 µL de água livre de RNase e 1 µL de cDNA das amostras obtido na reação de transcrição reversa, sendo que estas foram previamente quantificadas no espectrofotômetro NanoDrop ND1000 e diluídas a uma concentração final de 80 ng/µL.

As reações foram montadas em placas de 96 poços (*MicroAmp® Optical 96 Well Reaction Plate* – Applied Biosystems, Foster City, USA), nas quais foram adicionados o *mix* da reação e as amostras de cDNA. Após a montagem das reações de PCR, as placas foram devidamente seladas com o *MicroAmp® Optical Adhesive Covers* (Applied Biosystems, Foster City, USA). As placas foram colocadas no aparelho utilizado para amplificação e detecção, o *ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System* (Applied Biosystems, Foster City, USA), utilizando-se o seguinte programa: incubação (2min a 50°C), ativação da polimerase (10min a 95°C), seguido por quarenta ciclos de desnaturação do cDNA (15 segundos a 95°C), anelamento dos iniciadores (1min a 60°C), finalizando com o resfriamento (10min a 4°C).

3.4.4 Análise dos resultados

Os valores de C_T (*Cycle threshold*) fornecidos pelo *software ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System* (Applied Biosystems, Foster City, USA) foram exportados para planilhas do *Excel (MS Office 2007)*, a partir das quais foram realizadas as análises.

Para a comparação entre os grupos de indivíduos idosos saudáveis e os portadores de DA, foi utilizado o *software REST (Relative Expression Software Tool)* (Qiagen- *Technische Universität München*) – (Pfaffl, Horgan et al. 2002). Neste, foram adicionados os dados de C_T e o programa forneceu as análises de expressão relativa de cada gene, os valores estatísticos desses resultados, além de gráficos do tipo *Box plot*.

O *REST* associa métodos de randomização e *bootstrapping*, sendo calculada a significância estatística das razões de expressão, além de utilizar um modelo matemático que leva em consideração as diferentes eficiências dos iniciadores dos genes analisados. Além disso, esse programa permite utilizar vários genes de referência para a realização da normalização das amostras.

Para a análise adequada dos perfis transcricionais dos genes estudados, foi necessário escolher os genes de referência seriam mais apropriados para a normalização das amostras. Para isso, foi utilizado o *GeNorm method* (Vandesompele et al., *Genome Biology*, 2002).

3.5 Western blot

3.5.1 Extração de proteínas

As proteínas foram extraídas dos linfócitos utilizando o reagente Trizol (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. A precipitação foi realizada pela adição de 1.5 ml de isopropanol para cada 1mL de Trizol usado na homogeneização inicial. Em seguida, as proteínas foram incubadas por 10min a 15-30°C e centrifugadas a 12.000rpm por 10min a 2-8°C. Em seguida, as proteínas foram dissolvidas em SDS 1% e quantificadas em um espectrofotômetro, pela comparação com uma curva-padrão construída para a proteína soroalbumina bovina.

3.5.2 Eletroforese de proteínas

O perfil das proteínas foi analisado utilizando-se géis de Bis-Tris com dimensões 8x8x0.1 cm (Invitrogen). As amostras foram preparadas com 40µg de proteína. Em seguida, as proteínas foram desnaturadas a 70°C por 10min e posteriormente aplicadas ao gel. A eletroforese foi realizada em cubas (*XCell SureLock™ Mini-Cell/Invitrogen*) contendo tampão de corrida SDS (Invitrogen), sendo aplicados 200V por 35min.

3.5.3 Transferência eletroforética

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas do gel para membranas Invitrolon PVDF (Invitrogen) utilizando-se o sistema *XCell II™ Blot Module* (Invitrogen). Os componentes da transferência foram previamente imersos em tampão de transferência antes de serem colocados na cuba. A voltagem aplicada foi 30V por cerca de 90min, sendo que esse tempo variou dependendo do peso molecular da proteína a ser analisada. Para a confirmação da transferência das proteínas, as membranas foram coradas por 5 min com o corante *SimplyBlue™ SafeStain* (Invitrogen). Posteriormente, as mesmas foram lavadas e submetidas à imunodeteção.

3.5.4 Imunodeteção e visualização das proteínas

A imunodeteção e a visualização das proteínas foram realizadas com o auxílio do kit *WesternBreeze Chromogenic* (Invitrogen). A membrana foi imersa em 10mL de solução

bloqueadora e incubada durante 30min em um *shaker* rotatório. Em seguida, a mesma foi enxaguada com 20mL de água deionizada durante 5min e incubada com 10mL da solução de anticorpo primário por uma hora. O tempo de incubação com o anticorpo primário é variável, dependendo do anticorpo utilizado. Após esse passo, foram realizadas 4 lavagens de 5min com 20mL de solução de lavagem para anticorpos. A membrana então foi incubada em 10mL da solução de anticorpo secundário por 30min, sendo em seguida, novamente lavada 4 vezes por 5min com solução de lavagem para anticorpos. Posteriormente, foram realizados 3 enxágües com 20mL de água por 2min. Após este último, a membrana foi incubada com 5mL de substrato cromogênico até o aparecimento de bandas roxas em sua superfície. Finalmente, as membranas foram lavadas 3 vezes em água deionizada, sendo posteriormente secadas em papel de filtro. A quantificação das bandas foi realizada pelo software *Scion Imaging* (Scion Corporation, Frederick, Maryland, USA) (<http://www.scioncorp.com/index.htm>).

3.5.5 Anticorpos

Os anticorpos empregados neste trabalho foram os seguintes: anti- β Actina (Cell Signaling) na diluição de 1:1000, anti-TP53 (Ser15) (Cell Signaling) na diluição de 1:1000, anti-TP53 (Cell Signaling) na diluição de 1:1000, anti-SOD1 (Cell Signaling) na diluição de 1:1000, anti-ADAM10 (abcam) na diluição 1:1000, anti-ADAM17 (abcam) na diluição 1:1000.

3.5.6 Quantificação das imagens e análise estatística

A análise das bandas pelo programa Scion Image possibilitou quantificar a densidade dos sinais previamente capturados a partir da membrana contendo as bandas obtidas por *Western blot*, a qual foi escaneada.

Os resultados obtidos foram expressos como média $\pm$ desvio padrão e analisados com o programa SigmaStat 3.1 (Jandel Scientific) utilizando-se o teste ANOVA e as razões de probabilidade foram calculadas com intervalos de confiança de 95%.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação de sensibilidade e dinâmica de reparo dos danos no DNA por meio do Ensaio cometa

O ensaio cometa alcalino foi realizado com a finalidade de avaliar e quantificar a indução de danos no DNA causada pelo tratamento com peróxido de hidrogênio em linfócitos de portadores da DA, idosos controle e jovens saudáveis, além de observar a dinâmica do reparo dessas lesões. Os linfócitos foram cultivados por 48 horas, sendo que durante a última hora de cultura procedeu-se o tratamento com o peróxido de hidrogênio. A indução de danos permitiu avaliar a dinâmica do processo de reparo do DNA nesses diferentes grupos, pela análise em diferentes tempos (0; 0,5; 2 e 6 horas) de recuperação após o tratamento. Linfócitos de 8 indivíduos portadores de DA, 8 idosos controle e 5 jovens saudáveis foram utilizados para este ensaio.

Com a utilização do programa *Comet Assay IV (Perceptive Instruments Ltd)* foram analisadas 50 células/tratamento/indivíduo e o parâmetro escolhido para quantificação dos danos foi *Tail intensity* (porcentagem de DNA na cauda), considerado ideal para realização dessas medidas.

Sendo o processo de envelhecimento e a DA estritamente ligados ao estresse oxidativo, a enzima hOGG1 foi utilizada para a detecção de danos oxidativos, uma vez que sua propriedade como endonuclease detecta e cliva a molécula de DNA onde há base oxidada do tipo 8-oxoguanina. Dessa forma, essas bases oxidadas são detectadas como quebras na molécula de DNA no ensaio cometa.

Os dados analisados pelo teste estatístico *Two Way ANOVA* indicaram diferença significativa ($P < 0,05$) entre os três grupos de indivíduos submetidos aos tratamentos, mostrando que a cinética de indução e reparação dos danos no DNA varia entre os portadores de DA e os grupos controles analisados neste trabalho (Tabela 4.1; Figuras 4.1, 4.2) Além disso, houve diferença entre os resultados obtidos com a enzima hOGG1 em relação a ausência desse tratamento durante o ensaio.

Os resultados mostraram que os níveis basais de danos se apresentaram menores em DA que em idosos controles ou indivíduos jovens (Tabela 4.1; Figuras 4.1, 4.2). Entretanto, o tratamento com H_2O_2 causou um aumento maior de danos em DA em relação aos idosos do grupo controle, enquanto os jovens apresentaram apenas uma pequena diferença em relação ao controle não tratado. Em relação ao processo de recuperação, jovens e idosos controles mostraram-se mais eficientes que o grupo DA para atingir os níveis basais em 6 horas de recuperação.

O tratamento com a enzima hOGG1 aumentou os valores de *tail intensity*, conforme esperado, no entanto, as quantidades de danos entre os grupos seguiram as proporções visualizadas no ensaio convencional (Tabela 4.1, Figura 4.1). Quando observado a dinâmica do processo de reparo nos tempos determinados, houve diferença entre o tratamento com a enzima hOGG1 e o ensaio convencional. No ensaio convencional, apesar de não atingir os níveis basais, os controles tanto jovem quanto os idosos mostraram-se mais eficientes em reparar os danos gerados pelo tratamento com H₂O₂, após 6 horas de recuperação, enquanto os portadores de DA apresentaram uma maior deficiência para completar o processo de reparo. No ensaio cometa com a enzima hOGG1, tanto os portadores de DA quanto os idosos controle não foram capazes de reparar a maior parte dos danos verificados, enquanto os indivíduos jovens mostraram-se novamente proficientes nesse processo.

Tabela 4.1 – Valores das médias de *Tail intensity* obtidos por meio do ensaio cometa em linfócitos dos grupos de portadores de DA, idosos controles e jovens saudáveis; cultivados por 48h e tratados na última hora com H₂O₂, colhidos após de 0; 0,5; 2 e 6 h de recuperação.

Tempo (horas)	Convencional					
	DA		Idosos controles		Jovens	
	Controle	H ₂ O ₂	Controle	H ₂ O ₂	Controle	H ₂ O ₂
0	8,96	36,62	22,31	41,99	29,04	23,11
0,5	9,14	44,06	26,94	38,74	15,24	31,56
2	10,89	31,36	21,18	31,74	14,48	30,88
6	7,74	23,69	21,70	25,08	13,87	21,89

Tempo (horas)	hOGG1					
	DA		Idosos controles		Jovens	
	Controle	H ₂ O ₂	Controle	H ₂ O ₂	Controle	H ₂ O ₂
0	17,32	45,39	29,77	47,82	20,67	28,37
0,5	16,28	41,96	30,05	55,77	13,03	17,80
2	16,84	47,10	30,62	57,06	14,12	16,80
6	15,70	33,80	27,85	49,48	11,31	18,24

Figura 4.1 Danos no DNA quantificados pela porcentagem de DNA na cauda (*Tail intensity*), obtidos por meio do ensaio cometa. Os linfócitos cultivados por 48 horas foram submetidos ao tratamento com H₂O₂ por 1 hora, sendo colhidos após 0; 0,5; 2 e 6 horas de recuperação. Foram analisados 8 portadores de DA, 8 idosos controles e 5 jovens saudáveis. Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão. A) Ensaio cometa convencional. B) Ensaio cometa com hOGG1

Figura 4.2 Dinâmica de reparo do DNA de linfócitos tratados com H_2O_2 elaborado a partir das médias de porcentagem de danos no DNA em cada tempo de recuperação, mostrando também o erro padrão. **A)** Amostras de portadores de DA; **B)** Amostras de idosos controles; **C)** Amostras de jovens.

4.2 Expressão gênica transcricional (qRT-PCR)

A *PCR* quantitativa em tempo real propiciou a análise da expressão transcricional de alguns genes diretamente relacionados ao processamento de danos e reparo no DNA (*ATM*, *ATR*, *FANCG*, *FEN1*, *MTH1* e *CDKN1A*). Os dados foram analisados pelo programa REST 2009. A análise estatística demonstrou que os genes *CDKN1A* e *FANCG* foram significativamente induzidos em DA. Além disso, tendências de indução do gene *ATR* e de repressão dos genes *FEN1*, *ATM* e *MTH1* foram observadas; entretanto, as diferenças nos níveis de expressão desses genes não foram estatisticamente significativas (Tabela 4.2, Figuras 4.3 e 4.4).

Tabela 4.2 Níveis de expressão dos genes *ATM*, *ATR*, *MTH1*, *FEN1*, *FANCG* e *CDKN1A* em indivíduos com DA quando comparados aos controles de mesma faixa etária, e seus respectivos valores estatísticos. $P(H_1)$ representa a probabilidade da hipótese alternativa de que a diferença entre os grupos seja apenas devida ao acaso. Foram considerados induzidos ou reprimidos os genes cuja expressão obteve diferença estatisticamente significativa (“-” representa ausência de diferença significativa). Os dados foram gerados na análise efetuada pelo *software* REST.

Gene	Nível de Expressão	Erro padrão	Intervalo de confiança (95%)	$P(H_1)$	Regulação
<i>ATM</i>	0,791	0,345 - 2,743	0,017 - 4,531	0,806	-
<i>MTH1</i>	0,634	0,325 - 1,150	0,189 - 1,919	0,104	-
<i>ATR</i>	1,349	0,070 - 11,266	0,020 - 18,459	0,743	-
<i>FANCG</i>	2,444	1,136 - 4,567	0,744 - 30,005	0,012	Induzido
<i>FEN1</i>	0,372	0,046 - 2,637	0,008 - 10,776	0,247	-
<i>CDKN1A</i>	2,327	1,102 - 4,160	0,583 - 8,298	0,01	Induzido

Figura 4.3 Níveis de expressão gênica (valores relativos em *fold-change*) obtidos para a comparação entre pacientes com DA (n=7) e idosos controles (n=7), analisados por PCR quantitativa em tempo real. Os genes de referência utilizados foram *HPRT1*, *GUSB* e *B2M*.

Figura 4.4 Box plot mostrando a distribuição dos valores de expressão dos genes *ATM*, *MTH1*, *ATR*, *FANCG*, *FEN1* e *P21* em linfócitos de indivíduos com DA, comparados aos idosos da mesma faixa etária. Valores de expressão foram obtidos por qRT-PCR em tempo real por meio da análise pelo software *REST*.

4.3 Expressão gênica traducional (*Western blot*)

O método de *Western blot* propiciou a análise da expressão de algumas proteínas consideradas envolvidas na patogênese de DA. As proteínas ADAM10 e ADAM17 mostraram pequenas diferenças nos níveis de expressão quando comparados os grupos de pacientes DA e controle, sendo que a análise estatística demonstrou que tais diferenças não foram significativas ($p>0,05$) (Figuras 4.5 e 4.6).

A avaliação da expressão da proteína SOD1 demonstrou visualmente uma leve diminuição nos níveis de expressão em linfócitos de pacientes DA, no entanto, tal diminuição não foi estatisticamente significativa ($p>0,05$) entre os grupos DA e controle (Figuras 4.5 e 4.6).

Com relação à análise da expressão protéica para a proteína TP53, foram realizados experimentos que possibilitaram a identificação de duas formas desta, a proteína inativa e sua forma fosforilada na serina 15 (TP53(ser15)). Quanto aos resultados, pode-se notar uma indução estatisticamente significativa ($p<0,05$) da expressão de TP53 em DA. No entanto a expressão da TP53(ser15) não apresentou diferença significativa ($p>0,05$) entre os grupos DA e controle (Figuras 4.5 e 4.6).

Figura 4.5 Expressão das proteínas SOD1, TP53, TP53(ser15), ADAM17, ADAM10 e do controle endógeno β -actina em linfócitos de pacientes com DA e de indivíduos idosos controles, analisada por *Western blot*.

Figura 4.6 Valores obtidos na análise pelo programa *Scion Image*, referentes às médias dos valores de expressão proteica e seu desvio padrão. As proteínas foram extraídas a partir de linfócitos de pacientes (AD) e indivíduos controle (CO). * Diferença estatisticamente significativa (p<0,05). **A)** Proteína ADAM 10; **B)** Proteína ADAM 17; **C)** SOD1; **D)** TP53; **E)** TP53 (ser15).

5 DISCUSSÃO

O desenvolvimento de tratamentos efetivos para DA é dificultado por sua natureza complexa e multigênica. Apesar de muitos estudos mostrarem que a progressão dessa doença está estritamente associada a anormalidades metabólicas e oxidativas, a base molecular de sua patofisiologia permanece controversa (Smith, Richey Harris et al. 1997; Perry, Nunomura et al. 2003). Evidências apontam para um possível aumento de danos no DNA, principalmente dano oxidativo além da diminuição da atividade de reparo, como fatores envolvidos na patogênese da DA (Li and Kaminskas 1985; Robison, Munzer et al. 1987; Migliore, Fontana et al. 2005). No entanto, os resultados das pesquisas realizadas na área ainda não possibilitaram estabelecer a influência do dano oxidativo e determinar se este atua como causa ou consequência da doença. Assim é importante investigar os mecanismos moleculares envolvidos na DA, buscando elucidar o papel do estresse oxidativo, além de buscar a compreensão das vias de reparo do DNA e possíveis deficiências nesse processo que possam comprometer a integridade do material genético.

Assim, o presente trabalho buscou verificar se linfócitos do sangue periférico de portadores da DA apresentam deficiências nos mecanismos de reparo do DNA e/ou alterações em níveis transcricionais e traducionais em genes relacionados às vias de detecção e reparo desses danos. Os resultados obtidos reforçaram a hipótese de falhas nos mecanismos de reparo do DNA desses indivíduos, assim como o comprometimento de alguns genes relacionados a essa via, conforme será discutido a seguir.

5.1 Danos no DNA e cinética de reparo

O ensaio cometa alcalino permitiu verificar diferenças entre a eficácia dos mecanismos de reparo do DNA em linfócitos de indivíduos portadores da DA em comparação ao grupo de controles idosos da mesma faixa etária bem como com o grupo de jovens saudáveis. Após a coleta do sangue, os linfócitos foram separados e cultivados por 48 horas, tratados com 80 μ M de H₂O₂ durante a última hora de cultivo (tratamento por 1 hora), sendo colhidas amostras após 0; 0,5; 2 e 6 horas de recuperação para serem submetidas ao ensaio cometa.

Os resultados desse ensaio foram analisados por meio do teste estatístico *Two Way ANOVA* que demonstrou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos estudados. Esses dados mostraram que a resposta à indução de danos no DNA, assim como o processo de reparo, são diferentes entre jovens, idosos controles e idosos portadores de DA. Dessa forma, os dados indicaram que o processo de envelhecimento pode acarretar

mudanças na cinética de reparo do DNA. A comparação entre os grupos indicou diferenças na dinâmica do processo de reparo do DNA entre portadores de DA e os grupos controle das diferentes faixas etárias (jovens *versus* idosos), o que está de acordo com algumas hipóteses já postuladas para a DA (Leutner, Schindowski et al. 2005).

O H₂O₂ foi o agente usado para a indução dos danos e posterior observação da dinâmica do processo de reparo do DNA. No entanto, a indução de danos pelo tratamento com H₂O₂ não ocorre de maneira direta, uma vez que esta molécula é relativamente pouco reativa. Muitos dos danos que esta causa ao DNA são resultantes da produção de radicais hidroxil (OH•) que se ocorre na presença de metais, como por exemplo, o ferro, por meio de eventos como a Reação de Fenton (Imlay, Chin et al. 1988; Dizdaroglu 1991):

Por sua vez, o OH• é um oxidante extremamente reativo, com meia vida bastante curta. Essa molécula é capaz de danificar muitos componentes celulares, incluindo a molécula de DNA, tanto por sua ação direta quanto pela produção de novos ROS (Shackelford, Kaufmann et al. 2000). Como exemplo dos danos causados no DNA, podemos destacar quebras de fita simples e dupla, formação de sítios álcali-lábeis e oxidação de bases (Joenje 1989).

No presente trabalho, o tratamento com H₂O₂ mostrou-se mais eficaz em gerar danos na molécula de DNA em linfócitos de indivíduos portadores de DA aumentando o *tail intensity* de uma média de 8,96 de danos basais para 36,62 depois do tratamento; em idosos controles esses danos foram gerados em menor proporção, com a média do *tail intensity* variando de 22,31 nos níveis basais para 41,99 sob condições de tratamento. Em indivíduos jovens, a quantidade de danos induzidos pelo agente foi a menor em relação aos outros grupos.

Em relação à questão da diferença entre os grupos controle e DA, Leutner *et al.* (2005) mostraram que linfócitos de pacientes com DA são mais sensíveis a ROS, induzidas pelo tratamento com o composto químico estaurosporina, comparados aos linfócitos de indivíduos controles da mesma idade e de controles jovens. No entanto, quando incubados com outro composto químico, o dRib, a indução de ROS nos linfócitos de DA e de controles idosos foi praticamente a mesma, mas observou-se uma menor indução em indivíduos jovens. Esses dados são importantes quando comparados aos obtidos neste trabalho, embora tenha sido utilizado o peróxido de hidrogênio como agente gerador de danos; os resultados demonstram uma maior indução de danos nos linfócitos de portadores de DA em relação aos controles, e a indução nos indivíduos jovens foi menor. Assim, os três grupos apresentaram um padrão de resposta similar nos dois estudos, indicando que provavelmente os mecanismos envolvidos nas respostas à geração de dano oxidativo diferem entre os pacientes com DA e os indivíduos idosos controles. Entretanto, embora

possa ser considerado que o grupo de idosos controles representa uma condição normal de envelhecimento, essa condição não exclui uma séria de alterações progressivas ao longo da vida.

Os linfócitos originam-se de células tronco hematopoiéticas localizadas na medula óssea. Essas células têm um alto potencial de auto-renovação, podendo gerar uma grande população a partir de poucos progenitores (Bousso, Wahn et al. 2000; Weissman 2000). Isso implica em altas taxas de divisão celular e consequentemente propensão a altos índices de danos no DNA nos diferentes estágios de desenvolvimento (Rivera-Munoz, Malivert et al. 2007). Estudos demonstraram que células hematopoiéticas de indivíduos idosos apresentam diminuição dos telômeros em relação a indivíduos jovens, mostrando que a telomerase presente nestas células não é suficiente para conter os efeitos da proliferação intensa. Foi descrito ainda que células tronco hematopoiéticas são particularmente sensíveis ao acúmulo dos efeitos dos danos ao DNA a que foram expostas durante sua vida quando estes não são devidamente reparados (Nijnik, Woodbine et al. 2007; Rossi, Bryder et al. 2007).

Portanto, os linfócitos, apesar de serem células relativamente jovens no organismo, estão sujeitas a danos no DNA mesmo antes do seu processo de diferenciação. Se considerarmos que os níveis de dano oxidativo no DNA são maiores em células senescentes e que estão ainda ligados ao processo de envelhecimento e às doenças a este relacionadas (Hamilton, Van Remmen et al. 2001; Baynes 2002; Mattson 2003); e ao mesmo tempo, Duan *et al* (2005) mostraram que fibroblastos humanos jovens, tratados por um tempo prolongado com H_2O_2 , apresentaram mudanças similares à senescência replicativa, sendo que esse tratamento contínuo provocou acúmulo de dano no DNA associado à diminuição da capacidade de reparo das células, o aumento do estresse oxidativo e a diminuição dos mecanismos de reparo do DNA podem ser apontados como importantes fatores promotores de danos ao material genético. Assim, nos indivíduos idosos, os linfócitos podem demonstrar as conseqüências dos danos ao DNA acumulados ao longo da vida que os tornaram mais suscetíveis. Em relação aos portadores de DA, o próprio organismo é acometido por alterações homeostáticas provocadas por fatores como o acúmulo de determinadas proteínas, gerando um ambiente que pode ter deixado os linfócitos sujeitos ao acúmulo de danos e à diminuição da atividade de reparo.

Leutner *et al.* (2005) também compararam grupos de indivíduos semelhantes aos deste trabalho (jovens, idosos controle e portadores de DA) em relação aos danos basais à molécula de DNA e observaram níveis mais elevados em DA que nos controles idosos, e ainda menores em jovens. Ao contrário deste, no presente estudo, enquanto as quantidades de danos basais em idosos controles e jovens sadios foram semelhantes, os indivíduos com DA apresentaram um número reduzido desse tipo de dano.

Essa diferença foi um resultado inédito e precisa ser melhor estudada; talvez possa ser explicada pelo momento em que as células foram avaliadas. No trabalho de Leutner *et al.* (2005) as medições foram realizadas imediatamente após a coleta dos linfócitos, enquanto neste trabalho, por razões metodológicas, estes foram cultivados por 48 horas em meio de cultura.

O ensaio cometa com o pH alcalino possibilita detectar vários tipos de danos que geram quebra da fita de DNA; no entanto, apenas medições de quebras fornecem informações limitadas a respeito dos danos provocados na molécula. Essas quebras podem representar o efeito direto de alguns agentes que causam danos, mas que em geral são rapidamente reparados. As quebras visualizadas podem refletir ainda sítios abásicos e até mesmo etapas intermediárias de reparo do DNA, como já foi discutido (Collins 2004). Assim, para tornar a técnica mais sensível, foi utilizada uma enzima que reconhece um tipo particular de dano e cria uma quebra neste local. Essa enzima é a hOGG1, uma endonuclease específica que reconhece e catalisa a remoção de 8-oxoG da dupla fita de DNA, deixando um sítio abásico para que seja reparado pela maquinaria de BER (Boiteux and Radicella 2000; Christmann, Tomicic *et al.* 2003).

A utilização dessa enzima aumentou consideravelmente os níveis de danos no DNA, mas alterou pouco as proporções entre os grupos em relação as que foram observadas no ensaio convencional. Ou seja, para os três grupos estudados, nas amostras tratadas com H₂O₂, assim como nas não tratadas, a quantidade de danos visualizados no tempo 0h com a adição da enzima foi proporcional à quantidade encontrada no ensaio convencional. No entanto, houve diferenças importantes na cinética de reparo do DNA visualizada nos tempos de recuperação quando foi usada a enzima, que serão explicadas posteriormente.

Kadioglu *et al.* (2004) observaram por meio do ensaio cometa usando duas endonucleases específicas (Endo III e Fpg), aumento do dano oxidativo no DNA de linfócitos portadores de DA em relação aos controles e ressaltaram a possibilidade do aumento de danos por radicais livres associados à doença. No entanto, esses dados diferem dos obtidos no presente trabalho, uma vez que neste, mesmo os níveis basais de danos detectados após o tratamento com a enzima foram menores em DA. Ainda é possível estabelecer uma relação interessante entre estes dados quando se compara a metodologia usada em cada trabalho, como ocorreu quanto aos danos basais obtidos para as amostras submetidas ao ensaio convencional. Enquanto no trabalho de Kadioglu *et al.* (2004) os linfócitos eram imediatamente colhidos e testados, no presente trabalho as condições de cultivo das células durante dois dias pode ter gerado essa diferença, provavelmente pelo fato de que as células em cultura não ficam expostas às intempéries de um organismo acometido por altas taxas de estresse oxidativo. Entretanto, devem existir outros fatores que merecem ser investigados.

Em relação à indução de danos pelo H_2O_2 , Mórocz *et al.* (2002) encontraram maiores concentrações de 8OHdG em linfócitos de pacientes com DA que nos controles de mesma idade, quando tratados com $150\mu M$ de H_2O_2 por 5 minutos.

No presente estudo, a indução de danos foi maior em portadores de DA. Embora a média de danos observada após o tratamento tenha sido parecida entre DA e controles idosos, os danos basais, assim como no ensaio convencional, já eram menores em DA. Dessa forma, o dano basal cuja média de *tail intensity* foi 17,32 em DA aumentou para aproximadamente 45,39 com o tratamento, enquanto que em idosos controles passou de 29,77 para 46,47. Em relação aos indivíduos jovens, a indução desse tipo de dano oxidativo foi mínima. Morocz *et al.* (2002) também analisaram os linfócitos imediatamente após a colheita e mesmo as amostras tratadas não foram colocadas em cultura; e suspeitam que a explicação para a quantidade aumentada nos níveis basais de purina oxidada foi devida à presença de estresse oxidativo endógeno ou incapacidade de manutenção do equilíbrio redox na DA. Assim, o estresse oxidativo endógeno pode ser apontado como fator crucial nas diferenças observadas entre os resultados, confirmando a hipótese de que os danos basais possam ter influenciado a diferença entre os resultados, assim como foi sugerido para os danos basais observados no ensaio cometa convencional.

Quando estudada a dinâmica do processo de reparo nos tempos determinados, houve diferença entre o tratamento com a enzima hOGG1 e o ensaio convencional. No ensaio convencional, apesar de os níveis de danos não atingirem níveis basais, os controles tanto jovens quanto os idosos mostraram-se mais eficientes em reparar os danos gerados pelo tratamento com H_2O_2 , após seis horas de recuperação em relação aos portadores de DA. No ensaio cometa com a enzima hOGG1, tanto os portadores de DA quanto os idosos controles não foram capazes de reparar a maior parte dos danos induzidos, enquanto os indivíduos jovens mostraram proficiência nesse processo.

Conforme já foi amplamente mencionado, o acúmulo de danos no DNA está associado ao desbalanço entre a geração de danos no DNA, tanto pelo metabolismo endógeno quanto por agentes exógenos, e o processo de eliminação desses danos pela maquinaria celular de reparo. Com o processo de envelhecimento, as taxas de mutação parecem aumentar, indicando o declínio da eficiência do reparo de DNA com o aumento da idade dos indivíduos (Bohr and Anson 1995; Walter, Grabowski *et al.* 1997). Hazane *et al.* (2006) mostraram, por meio do ensaio cometa que fibroblastos humanos epiteliais apresentam reparo de dano induzido por UVA mais lento em relação à idade do indivíduo. Da mesma forma, Ivancsits *et al.* (2003) mostraram a diminuição dependente da idade da eficiência dos mecanismos de reparo de quebras no DNA em fibroblastos submetidos à irradiação por campo eletromagnético.

Assim, os dados do presente trabalho indicam que o fator idade contribui significativamente para o processo de reparação dos danos causados pelo H_2O_2 , em especial os danos oxidativos, reforçando a hipótese de diminuição da eficiência dos mecanismos de reparo do DNA durante o processo de envelhecimento e nas doenças a este relacionadas.

5.2 Regulação da expressão gênica

A análise da expressão gênica por PCR em tempo real em linfócitos de idosos saudáveis e idosos portadores da DA permitiu verificar os perfis transcricionais de importantes genes que participam da resposta ao estresse oxidativo. Assim, foi observado que os genes *FANCG* e *CDKN1A*, implicados no controle do ciclo celular e no reparo do DNA, estão induzidos nos pacientes com DA. Alterações nos perfis transcricionais dos genes *ATM*, *ATR*, *FEN1* e *MTH1* não foram estatisticamente significativas entre os grupos estudados.

Em humanos, o gene *MTH1* (mutT homolog-1) desempenha papel semelhante ao de mutT em *E. coli*. Quando comparados em relação às suas proteínas, há similaridade de 23% dos aminoácidos e quando a proteína humana foi expressada em *E. coli*, houve a diminuição da taxa de mutações espontâneas, atingindo frequências normais; dessa forma, a enzima humana tem a mesma capacidade de prevenção de mutações que a proteína MutT (Furuichi, Yoshida et al. 1994; Nakabeppu 2001).

Em *Escherichia coli*, a proteína MutT hidrolisa 8-oxo-dGTP, que é uma forma oxidada do nucleotídeo precursor dGTP (deoxiguanosina trifosfato), sendo uma das principais fontes endógenas de mutação espontânea. Durante a duplicação do DNA, 8-oxo-dGTP pode ser inserida na fita nascente, oposta a uma adenina ou citosina na fita molde, com quase a mesma eficiência, gerando transversões A:T para C:G (Cheng, Cahill et al. 1992; Maki and Sekiguchi 1992; Sekiguchi 1996). A hidrólise desse precursor pela MutT para sua forma monofosfato, elimina o substrato lesado do *pool* precursor de DNA (Maki and Sekiguchi 1992). A perda do gene mutT aumenta a ocorrência espontânea de transversões A:T para C:G em mil vezes em relação ao tipo selvagem (Tajiri, Maki et al. 1995). As purinas nucleosídeo trifosfato oxidadas, tais como 2-OH-dATP, 8-oxo-dGTP, 8-oxo-dATP e 8-oxo-GTP são hidrolisadas por suas monofosfatases correspondentes, por meio da ação da proteína MTH1 (Hayakawa, Taketomi et al. 1995).

O gene *MTH1* provavelmente possui um promotor que responde com eficiência tanto à atividade proliferativa quanto ao estresse oxidativo. Sendo assim, sob essas condições, a transcrição do gene é induzida (Oda, Nakabeppu et al. 1997). Assim, a proteína MTH1 é importante na manutenção da fidelidade da duplicação e transcrição do DNA, protegendo os indivíduos de doenças como o câncer e doenças neurodegenerativas (Nakabeppu 2001).

Song *et al.* (2011) mostraram um aumento nas quantidades de 8-oxoG no RNA e diminuição da expressão de MTH1 no hipocampo de pacientes com DA. Os autores sugeriram que a deficiência de MTH1 pode ser um fator relacionado ao processo de envelhecimento e às doenças a este relacionadas (Furuichi, Yoshida *et al.* 1994; Ishibashi, Hayakawa *et al.* 2005).

Para o gene *MTH1* não houve alteração estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre DA e idosos controles, porém, observou-se uma tendência à repressão desse gene na DA ($P(1) = 0,104$), o que pode estar relacionada à deficiência do reparo de dano oxidativo. Assim, a tendência à repressão mostrada pelos dados do presente trabalho, embora sem comprovação estatística, pode ter relação com o desenvolvimento da DA e merece ser investigada com mais detalhe, tanto ao nível transcricional quanto proteico.

O gene *FEN1* codifica uma proteína que pertence à família das *Flap* endonucleases, sendo considerada uma 5' nuclease específica, que pode atuar como endonuclease e também como exonuclease. Como endonuclease, *FEN1* reconhece especificamente a fita dupla de DNA com uma extremidade 5' desanelada, fazendo uma clivagem endonucleolítica na base dessa extremidade. Como exonuclease, a *FEN1* atua na degradação de nucleotídeos progressivamente a partir de uma incisão ou lacuna (Liu, Kao *et al.* 2004; Tsutakawa, Classen *et al.* 2011).

FEN1 tem funções cruciais na síntese da fita *lagging* da molécula de DNA, na via longa do reparo por excisão de bases, e de maneira geral, na manutenção da estabilidade genômica. Estudos recentes demonstraram que essa proteína exerce ainda funções no processo de apoptose, controle do ciclo celular, manutenção da estabilidade dos telômeros, no reparo NHEJ e até mesmo na junção *Holliday* (Frosina, Fortini *et al.* 1996; Parenteau and Wellinger 1999; Negritto, Qiu *et al.* 2001; Sharma, Otterlei *et al.* 2004).

No reparo por excisão de bases, a atuação da *FEN1* é uma das mais bem descritas e esclarecidas. Após ser feita a incisão 5' no sítio AP pela proteína *APE1*, o complexo *Polδ/ε*, *PCNA* e *FEN1* se desloca na fita 3' até a incisão, produzindo uma estrutura em *flap* de 2 a 10 nucleotídeos, a qual será cortada pela *FEN1* endonuclease, sendo que a partir disso, esse trecho da fita é reconstruído pela polimerase (Frosina, Fortini *et al.* 1996; Sancar and Reardon 2004).

Apesar da extensa gama de atuação da proteína codificada pelo gene *FEN1*, houve uma tendência à repressão da transcrição desse gene em idosos com DA, apesar de não ter havido significância estatística. Seria interessante avaliar a atividade da proteína *FEN1* em portadores de DA, uma vez que esta participa ativamente da via BER, provavelmente comprometida na doença.

Em relação ao gene *FANCG*, este pertence ao grupo de genes da série FANC, mutados em pacientes com anemia de Fanconi (FA). A FA é uma doença autossômica recessiva caracterizada por alta susceptibilidade ao câncer, anormalidades congênitas, falhas na medula óssea e alta incidência de leucemia e tumores sólidos (Alter 1999; Mi, Qiao et al. 2004; Moldovan and D'Andrea 2009). Essa doença é geneticamente heterogênea causada por mutações em um dos treze genes até então identificados ((Levitus, Joenje et al. 2006; Smogorzewska, Matsuoka et al. 2007). Os produtos codificados por esses genes não se assemelham a proteínas conhecidas e têm poucos motivos funcionais indentificados (Mi, Qiao et al. 2004; Wilson, Yamamoto et al. 2008).

Uma característica biológica da FA é que as células em cultura, assim como os próprios pacientes, exibem hipersensibilidade a agentes que geram *cross-links* no DNA. Essa sensibilidade resulta em quebra cromossômica, que é uma característica fenotípica utilizada em testes clínicos para FA. A reação aos crosslinks pode também ser manifestada pelo atraso em G2, o que pode ser visto como defeito da fase S nas células com FA (Dutrillaux, Aurias et al. 1982; Kaiser, Lojewski et al. 1982; Kupfer, Naf et al. 1997). Não obstante, os mecanismos bioquímicos envolvidos nesse processo não foram ainda elucidados (Wilson, Yamamoto et al. 2008).

As proteínas FA parecem estar interrelacionadas e participam de pelo menos dois complexos (Kupfer, Naf et al. 1997; Naf, Kupfer et al. 1998). O primeiro, o complexo nuclear, envolve FANCA, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, e FANCL (Garcia-Higuera, Kuang et al. 1999; Waisfisz, de Winter et al. 1999; Christianson and Bagby 2000; de Winter, van der Weel et al. 2000; Meetei, de Winter et al. 2003). O segundo é composto por FANCD2 e FANCE (Garcia-Higuera, Taniguchi et al. 2001). A integridade do complexo nuclear é essencial para a monoubiquitinação da proteína FANCD2 que ocorre em resposta a danos do DNA, incluindo a formação de *crosslinks* e lesão oxidativa. Durante o ciclo celular, a FANCD2 monoubiquitinada aparece durante a fase S e se localiza com BRCA1 e Rad51 em regiões em que há quebra dupla da fita de DNA. A BRCA1 e a Rad51 são proteínas importantes na via de reparo de quebras duplas pelo processo de recombinação homóloga (Taniguchi, Garcia-Higuera et al. 2002; Hinz, Nham et al. 2007)

O reparo por recombinação homóloga usa a cromátide-irmã como molde para o reparo de quebras de fita dupla causadas por agressões externas como as radiações ionizantes, assim como para reiniciar forquilha de duplicação lesionadas durante a síntese de DNA (Thompson and Schild 2001; Helleday 2003). Esses processos são facilitados pela rad51 recombinase, a qual requer proteínas mediadoras como BRCA2 e outros cinco parálogos de Rad51. A identificação de FANCD1 como BRCA2 (Howlett, Taniguchi et al. 2002), e as associações físicas entre FANC e as proteínas de reparo por recombinação homóloga (Hussain, Wilson et al. 2006), sugerem o papel das proteínas FANC em prevenir

ou reparar quebras nas forquilhas de duplicação, destacando-se uma potencial ligação entre as proteínas FA e as proteínas da via de reparo por recombinação homóloga (Hinz, Nham et al. 2007).

Wilson *et al.* (2008) propuseram que a proteína FANCG participa de um complexo com BRCA2, FANCD2 e XRCC3. Este complexo apresenta importante função no reparo de *crosslinks* por meio do processo de reparo por recombinação homóloga. Segundo Hinz et. al. (2007), o reparo homólogo restaura com fidelidade forquilhas de replicação quebradas, enquanto as vias da FA atuam mais globalmente para manter a estabilidade cromossômica, promovendo uma eficiente união das quebras derivadas da duplicação do DNA, assim como no reparo homólogo e na síntese translesão.

A fosforilação de FANCG ocorre nas serinas 7, 383 e 387 e essas modificações são funcionalmente importantes para resistência celular a danos do tipo *crosslinks* (Mi, Qiao et al. 2004). Em linfoblastos, a proteína alterada FANCG-S7A é capaz de se ligar e estabilizar FANCA e FANCC, apesar de a monoubiquitinação de FANCD2 ser reduzida. No entanto, foi bem estabelecido que FANCG é crítica para a montagem funcional do cerne do complexo nuclear (Garcia-Higuera, Kuang et al. 1999; Waisfisz, de Winter et al. 1999; Gordon and Buchwald 2003).

Foi sugerido que a proteína FANCG pode ter importante função no reparo e na proteção contra dano oxidativo (Degan, Bonassi et al. 1995; Futaki, Igarashi et al. 2002; Pagano and Youssoufian 2003). Provavelmente, a indução de *FANCG* em indivíduos com DA pode estar relacionada ao estresse oxidativo ao qual essas células estão submetidas, visto as inúmeras funções que este gene pode desempenhar ligadas ao reparo e processamento de danos no DNA.

Há evidência de que o sistema ubiquitina-proteassoma apresente falhas nas células de portadores de DA (Song and Jung 2004; Oddo 2008). A proteína FANCG, por ter uma papel importante em um complexo com função E3 ligase é uma peça importante no entendimento da doença, uma vez que o respectivo gene codificador tenha se apresentado induzido em portadores de DA. Sem dúvida, seria interessante investigar possíveis mutações e alterações funcionais em outros genes da via FA.

As proteínas codificadas pelos genes *ATM* e *ATR* são proteínas quinases membros da família fosfatidilinositol 3-quinase, que também incluem as DNA-PKs (Lempiainen and Halazonetis 2009). As proteínas ATM e ATR são capazes de ativar uma complexa resposta de sinalização a vários estímulos, principalmente aos danos no DNA. Ainda não está claro se ATM desempenha algum papel além da ativação da resposta ao dano no DNA, que possa estar ligado ao processo de neurodegeneração (Tibbetts, Brumbaugh et al. 1999; Shiloh 2003; Subba Rao 2007; Guo, Deshpande et al. 2010; Cosentino, Grieco et al. 2011).

ATM foi inicialmente descrita como componente crítico na resposta a quebras de fita dupla, no entanto, tem sido demonstrado o seu papel na resposta a danos causados por ROS, visto que esta proteína protege do acúmulo de ROS estimulando a produção de NADPH e promovendo a síntese de nucleotídeos necessários para o reparo de quebra dupla (Shiloh 2003; Guo, Deshpande et al. 2010; Cosentino, Grieco et al. 2011).

ATR é ativada principalmente por quebras terminais de fita simples, que são geradas após a indução de aductos de DNA durante o processo de quebra de fita dupla, ou problemas na forquilha de replicação. O tamanho e o tipo da quebra determinam como será ativação da ATR. Há ainda evidências de que esta proteína possa ser ativada por outros mecanismos (Zou 2007; Cimprich and Cortez 2008; Shiotani and Zou 2009; Flynn and Zou 2011).

ATM e ATR apresentam redundância funcional e compartilham sobreposição de substrato específico; ambos fosforilam preferencialmente em seus substratos, resíduos serina ou treonina que são seguidos por glutamina (motivos SQ/TQ) (Lavin and Kozlov 2007; Cimprich and Cortez 2008; Lovejoy and Cortez 2009; Derheimer and Kastan 2010). Foram identificadas mais de 700 proteínas contendo motivos de fosforilação ATM/ATR (Matsuoka, Ballif et al. 2007). Um importante alvo para essas proteínas é a TP53, que sofre ativação e estabilização em resposta a danos no DNA. Essa regulação pode ser feita por meio da fosforilação direta da molécula, ou indiretamente pela fosforilação de vários outros reguladores (Pereg, Shkedy et al. 2005; Pereg, Lam et al. 2006; Levine and Oren 2009; Cheng and Chen 2010). Alguns dos substratos de ATM/ATR são proteínas quinases com alvos *downstream*, principalmente CHK1 e CHK2 (Chen and Poon 2008; Smith, Tho et al. 2010).

A expressão dos genes *ATM* e *ATR* seria esperada, uma vez que a DA é caracterizada por altas taxas de dano oxidativo, que poderiam requerer a expressão desses genes. No entanto, além de não ser observada indução transcricional desses genes, os resultados de *Western blot* confirmaram a ausência de expressão das proteínas respectivas, uma vez que a proteína TP53 fosforilada na serina15, que é um dos alvos de ATM/ATR também não foi detectada neste trabalho.

Outro transcrito gênico estudado e induzido é do gene *CDKN1A*. Este codifica uma proteína que é membro da família dos inibidores de CDK (cyclin dependent kinases), a *CDKN1A*, também conhecida como p21. Esta é responsável por controlar a transição G1/S por meio da ligação aos complexos ciclina D-CDK4, ciclina E-CDK2, e ciclina A-CDK2 (Gu, Turck et al. 1993; Harper, Adami et al. 1993; Xiong, Hannon et al. 1993; Jung, Qian et al. 2010).

Sinais de estresse chegam de várias vias e todos parecem convergir para ativação da proteína TP53, culminando na ativação dos alvos desta, como o gene *CDKN1A* (Giaccia and Kastan 1998; Ashcroft and Vousden 1999; Prives and Hall 1999). A indução transcricional desse gene é regulada por vias dependentes e independentes de TP53 (Macleod, Sherry et al. 1995). A *CDKN1A* pode se ligar à PCNA, interferindo em suas interações com o fator de replicação C, com a DNA polimerase e com FEN1, inibindo a replicação do DNA, *in vitro*. Altas concentrações de *CDKN1A* são requeridas para inibir a atividade da PCNA no reparo do DNA e então reprimir a duplicação *in vitro* (Li, Waga et al. 1994; Podust, Podust et al. 1995; Chen, Chen et al. 1996; Oku, Ikeda et al. 1998; Waga and Stillman 1998). Apesar de muita informação a respeito desse gene, os mecanismos que atuam sobre a sua regulação permanecem ainda não completamente elucidados.

A *CDKN1A* é ainda substrato para sistema proteassoma, no entanto, sua degradação não requer ubiquitinação das lisinas, mas ao invés disso, a ubiquitinação N-terminal parece ter papel chave na sua degradação (Blagosklonny, Wu et al. 1996; Sheaff, Singer et al. 2000; Bloom, Amador et al. 2003). O *turnover* de muitas ciclinas e inibidores de CDKs é regulado ao longo do ciclo celular (Li and Blow 2001; Spruck and Strohmaier 2002). Em relação à *CDKN1A*, foi demonstrado que a ciclina D1 pode ter um papel direto em seu *turnover* (Coleman, Marshall et al. 2003).

A estimulação de células quiescentes por soro resultou na indução da proteína *CDKN1A*, a qual é ligada ao aumento dos níveis de mRNA pra essa proteína (Macleod, Sherry et al. 1995; Cai and Dynlacht 1998). Por sua vez, sinais de estresse que causam parada em G1, tais como radiação γ ou ultra-violeta ou actinomicina D não causam aumento na meia vida de *CDKN1A* (Maki and Sekiguchi 1992; Sheaff, Singer et al. 2000), sugerindo que sob essas condições de estresse seu acúmulo depende apenas do aumento da transcrição.

Dessa forma, a indução da transcrição do gene *CDKN1A* observada neste estudo pode estar associada à elevada taxa de estresse associada à DA, mostrando que umas das vias ativadas pela proteína TP53 possivelmente se encontra induzida nesses indivíduos, o que está de acordo com os dados de expressão obtidos por *Western blot* no presente trabalho, discutidos adiante.

Por meio da técnica de *Western blot*, foi possível avaliar a expressão das proteínas TP53 e sua forma fosforilada (serina 15), além da SOD1, e das proteínas envolvidas na degradação de APP, ADAM10 e ADAM17.

Em relação à proteína TP53, esta foi significativamente mais expressa em indivíduos DA relativamente aos indivíduos controles. No entanto, a análise da mesma proteína na

forma fosforilada na serina 15 não mostrou diferença significativa entre pacientes e controles, constatando-se uma baixa expressão em ambos os grupos.

A importância da proteína supressora de tumor TP53 é devida ao seu papel fundamental na regulação negativa da progressão do ciclo celular por meio da ativação da transcrição de inúmeros dos seus genes reguladores, podendo em alguns momentos interromper a proliferação celular e até mesmo conduzir a célula à apoptose. Esta proteína é, então, responsável por prevenir o acúmulo de alterações genéticas irreversíveis que possam causar transformação nas células. Assim, sua atuação permite a manutenção da integridade genômica ao longo do ciclo celular e por essa propriedade, a TP53 foi considerada “guardiã do genoma” (Agarwal, Agarwal et al. 1998; Attardi and Jacks 1999).

Existem algumas proteínas responsáveis pela manutenção da regulação ideal da TP53 na célula. Sob condições normais, esta é muito instável com uma meia vida curta de 20 a 25 minutos (Reich and Levine 1984; Mosner, Mummenbrauer et al. 1995). Os níveis baixos de TP53 nas células não submetidas a estresse são, portanto, resultado de um *turnover* rápido (Oren and Rotter 1999). A degradação rápida dessa proteína é mediada pela MDM2, cujos transcritos são ativados pela própria TP53. MDM2 se liga diretamente à região N-terminal de TP53 e inibe suas atividades transcricionais. Além disso, MDM2 é uma E3 ubiquitina-ligase que promove a degradação da TP53 pelo sistema proteassoma (Yee and Vousden 2005). É importante observar que enquanto a monoubiquitinação da TP53 promove sua exportação para o citoplasma, a poliubiquitinação induz a sua degradação (Yee and Vousden 2005).

Como há evidência de que a DA também está associada a disfunções no sistema ubiquitina-proteassoma, adicionada ao fato de que a degradação da TP53 é diretamente ligada a este sistema, pode-se sugerir uma possível correlação entre esses fatores. Uma hipótese para a presença de concentrações elevadas da proteína TP53 nas células desses indivíduos pode estar relacionada a falhas nesse sistema de degradação. Dessa forma, os genes relacionados a essa regulação negativa da proteína, como por exemplo, o MDM2, merecem ser estudados com detalhe.

Em células sob estresse, várias proteínas são responsáveis pela regulação da ativação da TP53. O gene *ARF*, por exemplo, cuja transcrição é aumentada pela elevação nos níveis de E2F, dá origem a uma proteína que se liga ao MDM2 e bloqueia sua associação ao TP53, promovendo aumento dos níveis desta. CHK1 e CHK2 também são responsáveis por essa ativação, pela fosforilação da TP53 na serina 20, bloqueando sua interação com MDM2. Outros reguladores dessa ativação são as proteínas ATM e ATR, que induzem a TP53, por meio da fosforilação de vários resíduos N-terminais, entre eles a serina 15 (Bartek and Lukas 2001; Ho, Siu et al. 2006).

Sob condições normais, quando a parada no ciclo e a apoptose não devem ser induzidas, a TP53 precisa ser mantida em baixos níveis por seus inibidores, de outra forma, pode acarretar consequências drásticas para a célula, o que evidencia a importância de averiguar a relação da indução com a patologia da DA.

Ohyagi *et al.* (2005) mostraram que a TP53 pode ter sua regulação alterada pela atuação nuclear da A β 42, promovendo apoptose neuronal dependente de TP53, por meio da ativação do promotor do gene que a codifica.

A proteína TP53 foi associada a processos neurodegenerativos, podendo ser considerada um possível biomarcador em linfócitos para a DA. Em pacientes com DA foi relatado um comprometimento da estrutura terciária da TP53, que altera a sua função levando a uma resposta diferente sob condições de injúria citotóxica (Lanni, Racchi *et al.* 2008). Há evidências de que a TP53 encontrada em excesso nos tecidos periféricos, como fibroblastos epiteliais e células mononucleadas do sangue de indivíduos com DA sejam formas com conformação alterada (Uberti, Carsana *et al.* 2002; Lanni, Racchi *et al.* 2008).

Os resultados do presente trabalho mostraram que, apesar da TP53 ser bastante expressa em DA, a sua ativação (fosforilação na serina 15) não foi observada. Segundo a literatura, essa ativação é geralmente mediada pelas proteínas ATM, ATR ou DNA PK (Tibbetts, Brumbaugh *et al.* 1999). Estes resultados apoiam os dados obtidos quanto à expressão transcricional, os quais não mostraram diferenças nos níveis de ATM e ATR nos pacientes com DA comparados a idosos de mesma faixa etária. Foi observada também a indução transcricional do gene *CDKN1A* que pode ter sido consequência do aumento da proteína TP53.

Uberti *et al.* (2002) trataram fibroblastos epiteliais de indivíduos portadores de DA em comparação a controles não-DA com H₂O₂ e observaram uma deficiência dessas células de DA em ativar as vias dependentes de TP53 para parada no ciclo celular e apoptose. Não foi observada também a ativação de seus genes alvo, como *CDKN1A*, demonstrando alterações nas vias de detecção e reparo dos danos no DNA em tecidos periféricos de portadores da DA. De acordo com esses dados pode-se estabelecer uma relação com a deficiência dos mecanismos de reparo em DA visualizados neste trabalho por meio do ensaio cometa, porém contrasta com os dados de expressão gênica transcricional, que mostraram a indução da transcrição de *CDKN1A* nos portadores de DA.

Dessa forma, estudos no sentido de elucidar o papel da TP53 na patologia da DA e as vias a esta relacionadas permitirão uma maior compreensão da doença no organismo como um todo.

As proteínas ADAM10 e ADAM17 estão relacionadas ao papel de α -secretase; elas atuam na quebra da proteína precursora de amiloide, de modo que esta não seja

transformada em A β , podendo evitar a deposição de placas amilóides, características da DA. Neste trabalho, a análise da expressão destas proteínas foi realizada, comparando pacientes DA com indivíduos controles, mas as diferenças apresentadas entre os dois grupos não foram estatisticamente significativas, provavelmente porque foram analisados em linfócitos periféricos.

Colciaghi *et al.* (2002) observaram uma diminuição significativa na expressão de ADAM10 em plaquetas sanguíneas de pacientes DA. Colciaghi *et al.* (2004) apontaram uma correlação entre a diminuição da expressão de ADAM10 e o aumento de BACE, uma β -secretase que atua no processo amiloidogênico nas células de pacientes com DA, mesmo naqueles em estágio inicial da doença.

Lammich *et al.* (1999) também observaram a importância de ADAM10 na clivagem de APP de maneira a inibir o processo amiloidogênico em células de rim bovino; no entanto, descreveram uma possível mutação de ponto, a qual poderia modificar a proteína, prejudicando a sua ação.

A proteína ADAM17 mostrou-se levemente menos expressa em linfócitos de pacientes DA, embora a diferença com o grupo controle não tenha sido significativa. Essa proteína desempenha um importante papel na regulação da via de *Notch* (Brou, Logeat *et al.* 2000) e está estreitamente relacionada com a sua indução.

Os linfócitos provavelmente diferem dos neurônios quanto aos perfis de expressão para várias proteínas, sendo que pequenas alterações nos níveis de expressão são plausíveis de serem observadas.

Outra proteína analisada neste trabalho, a qual foi relatada como diferencialmente expressa em tecidos cerebrais na patologia DA foi a SOD1 (Choi, Rees *et al.* 2005). Entretanto, no presente trabalho, a expressão desta não se mostrou estatisticamente diferente ($p > 0,05$) entre linfócitos de pacientes DA e seus respectivos controles. Essa proteína é uma enzima antioxidante com papel importante na catálise dos radicais superóxido em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio (Fridovich 1995). Contrariamente, é um dos principais alvos do estresse oxidativo em cérebro de pacientes com DA e Parkinson (Choi, Kim *et al.* 2005).

Há evidências de que mutações em SOD1 causam neurodegeneração por meio do ganho de função citotóxica e pela perda da capacidade enzimática (Valentine and Hart 2003). Choi *et al.* (2005) sugerem ainda que as formas alteradas de SOD1 formam agregados associados a placas amiloidogênicas, contribuindo para o desencadeamento da patogênese.

No presente trabalho, há que ser considerada a possibilidade de que diferenças significativas na expressão da SOD1 em pacientes DA e controles possam não ter sido detectadas pelo fato de o anticorpo utilizado não discriminar as proteínas alteradas

(resultantes de mutação) das não-alteradas. É possível também que a proteína seja normalmente transcrita e traduzida e que as diferenças possam existir em termos de atividade enzimática. Ainda, um outro aspecto a ser considerado é se os linfócitos realmente podem mostrar alterações típicas associadas ao desenvolvimento da DA, sendo que esta questão permanece aberta e continua sendo uma abordagem interessante a ser pesquisada.

O uso de linfócitos de sangue periférico como modelo de estudo para a DA indicou que pelo menos alguns genes podem mostrar perfis de expressão alterados nesta doença, embora para alguns outros genes, a expressão possa não seguir o padrão relatado na literatura para os neurônios desses pacientes. Assim, embora os linfócitos não constituam o tecido alvo afetado na patologia, eles podem de alguma forma refletir algumas das alterações da DA.

6 CONCLUSÕES

Os resultados da avaliação dos danos ao material genético induzidos pelo H₂O₂ e a observação da dinâmica do processo de reparo do DNA indicaram diferenças significativas entre os linfócitos de indivíduos portadores de DA, idosos controles e jovens saudáveis. Essas diferenças observadas entre os grupos refletem não só alterações relacionadas à condição DA, mas também associadas ao próprio processo de envelhecimento.

Em relação aos perfis de expressão gênica transcricional e traducional, importantes alterações foram encontradas nos transcritos dos genes *FANCG* e *CDKN1A* e na proteína TP53. Essas alterações demonstram o comprometimento de vias importantes de reparo do DNA, regulação do ciclo celular e manutenção da estabilidade e integridade genômica, que merecem continuidade de investigação.

A busca por genes ou proteínas que sejam expressos diferencialmente em tecidos de pacientes com DA é de extrema importância para o diagnóstico e tratamento dos mesmos. Assim, o presente estudo realizado em linfócitos de sangue periférico indica que pelo menos de forma parcial, essas células podem refletir algumas das alterações associadas à condição DA, motivando a continuidade de pesquisa segundo essa abordagem.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agarwal, M. L., A. Agarwal, et al. (1998). "A p53-dependent S-phase checkpoint helps to protect cells from DNA damage in response to starvation for pyrimidine nucleotides." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(25): 14775-14780.
- Alter, B. P. (1999). "Bone marrow failure syndromes." Clin Lab Med **19**(1): 113-133.
- Ashcroft, M. and K. H. Vousden (1999). "Regulation of p53 stability." Oncogene **18**(53): 7637-7643.
- Attardi, L. D. and T. Jacks (1999). "The role of p53 in tumour suppression: lessons from mouse models." Cell Mol Life Sci **55**(1): 48-63.
- Avramopoulos, D. (2009). "Genetics of Alzheimer's disease: recent advances." Genome Med **1**(3): 34.
- Balaban, R. S., S. Nemoto, et al. (2005). "Mitochondria, oxidants, and aging." Cell **120**(4): 483-495.
- Bartek, J. and J. Lukas (2001). "Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage." Curr Opin Cell Biol **13**(6): 738-747.
- Baynes, J. W. (2002). "The Maillard hypothesis on aging: time to focus on DNA." Ann N Y Acad Sci **959**: 360-367.
- Behl, C., J. B. Davis, et al. (1994). "Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity." Cell **77**(6): 817-827.
- 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**: 125-134.
- Bergem, A. L., K. Engedal, et al. (1997). "The role of heredity in late-onset Alzheimer disease and vascular dementia. A twin study." Arch Gen Psychiatry **54**(3): 264-270.
- Bjelland, S. and E. Seeberg (2003). "Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation." Mutat Res **531**(1-2): 37-80.
- Blagosklonny, M. V., G. S. Wu, et al. (1996). "Proteasome-dependent regulation of p21WAF1/CIP1 expression." Biochem Biophys Res Commun **227**(2): 564-569.

- Bloom, J., V. Amador, et al. (2003). "Proteasome-mediated degradation of p21 via N-terminal ubiquitylation." Cell **115**(1): 71-82.
- Bohr, V. A. and R. M. Anson (1995). "DNA damage, mutation and fine structure DNA repair in aging." Mutat Res **338**(1-6): 25-34.
- 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.
- Bokov, A., A. Chaudhuri, et al. (2004). "The role of oxidative damage and stress in aging." Mech Ageing Dev **125**(10-11): 811-826.
- Bousso, P., V. Wahn, et al. (2000). "Diversity, functionality, and stability of the T cell repertoire derived in vivo from a single human T cell precursor." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(1): 274-278.
- 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): 207-216.
- 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): 27765-27767.
- Cai, K. and B. D. Dynlacht (1998). "Activity and nature of p21(WAF1) complexes during the cell cycle." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(21): 12254-12259.
- Caspersen, C., N. Wang, et al. (2005). "Mitochondrial Abeta: a potential focal point for neuronal metabolic dysfunction in Alzheimer's disease." FASEB J **19**(14): 2040-2041.
- Chen, C. M. and J. F. Yang (2000). "Layer Winner-Take-All neural networks based on existing competitive structures." IEEE Trans Syst Man Cybern B Cybern **30**(1): 25-30.
- Chen, U., S. Chen, et al. (1996). "p21Cip1/Waf1 disrupts the recruitment of human Fen1 by proliferating-cell nuclear antigen into the DNA replication complex." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(21): 11597-11602.
- Chen, Y. and R. Y. Poon (2008). "The multiple checkpoint functions of CHK1 and CHK2 in maintenance of genome stability." Front Biosci **13**: 5016-5029.
- Cheng, K. C., D. S. Cahill, et al. (1992). "8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G----T and A----C substitutions." J Biol Chem **267**(1): 166-172.
- Cheng, Q. and J. Chen (2010). "Mechanism of p53 stabilization by ATM after DNA damage." Cell Cycle **9**(3): 472-478.

- Choi, S. H., D. W. Kim, et al. (2005). "Transduced human copper chaperone for Cu,Zn-SOD (PEP-1-CCS) protects against neuronal cell death." Mol Cells **20**(3): 401-408.
- Christianson, T. A. and G. C. Bagby (2000). "FANCA protein binds FANCG proteins in an intracellular complex." Blood **95**(2): 725-726.
- Christmann, M., M. T. Tomicic, et al. (2003). "Mechanisms of human DNA repair: an update." Toxicology **193**(1-2): 3-34.
- Cimprich, K. A. and D. Cortez (2008). "ATR: an essential regulator of genome integrity." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(8): 616-627.
- Colciaghi, F., B. Borroni, et al. (2002). "[alpha]-Secretase ADAM10 as well as [alpha]APPs is reduced in platelets and CSF of Alzheimer disease patients." Mol Med **8**(2): 67-74.
- Coleman, M. L., C. J. Marshall, et al. (2003). "Ras promotes p21(Waf1/Cip1) protein stability via a cyclin D1-imposed block in proteasome-mediated degradation." Embo J **22**(9): 2036-2046.
- Collins, A. R. (2004). "The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations." Mol Biotechnol **26**(3): 249-261.
- Coppede, F. and L. Migliore (2009). "DNA damage and repair in Alzheimer's disease." Curr Alzheimer Res **6**(1): 36-47.
- Cosentino, C., D. Grieco, et al. (2011). "ATM activates the pentose phosphate pathway promoting anti-oxidant defence and DNA repair." Embo J **30**(3): 546-555.
- Croteau, D. L. and V. A. Bohr (1997). "Repair of oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNA in mammalian cells." J Biol Chem **272**(41): 25409-25412.
- de Winter, J. P., L. van der Weel, et al. (2000). "The Fanconi anemia protein FANCF forms a nuclear complex with FANCA, FANCC and FANCG." Hum Mol Genet **9**(18): 2665-2674.
- de Zwart, L. L., J. H. Meerman, et al. (1999). "Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans." Free Radic Biol Med **26**(1-2): 202-226.
- Degan, P., S. Bonassi, et al. (1995). "In vivo accumulation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA correlates with release of reactive oxygen species in Fanconi's anaemia families." Carcinogenesis **16**(4): 735-741.
- Derheimer, F. A. and M. B. Kastan (2010). "Multiple roles of ATM in monitoring and maintaining DNA integrity." FEBS Lett **584**(17): 3675-3681.

- Dizdaroglu, M. (1991). "Chemical determination of free radical-induced damage to DNA." Free Radic Biol Med **10**(3-4): 225-242.
- Droge, W. (2002). "Free radicals in the physiological control of cell function." Physiol Rev **82**(1): 47-95.
- Duan, J., Z. Zhang, et al. (2005). "Irreversible cellular senescence induced by prolonged exposure to H₂O₂ involves DNA-damage-and-repair genes and telomere shortening." Int J Biochem Cell Biol **37**(7): 1407-1420.
- Dutrillaux, B., A. Aurias, et al. (1982). "The cell cycle of lymphocytes in Fanconi anemia." Hum Genet **62**(4): 327-332.
- Flynn, R. L. and L. Zou (2011). "ATR: a master conductor of cellular responses to DNA replication stress." Trends Biochem Sci **36**(3): 133-140.
- Fridovich, I. (1995). "Superoxide radical and superoxide dismutases." Annu Rev Biochem **64**: 97-112.
- Frosina, G., P. Fortini, et al. (1996). "Two pathways for base excision repair in mammalian cells." J Biol Chem **271**(16): 9573-9578.
- Furuichi, M., M. C. Yoshida, et al. (1994). "Genomic structure and chromosome location of the human mutT homologue gene MTH1 encoding 8-oxo-dGTPase for prevention of A:T to C:G transversion." Genomics **24**(3): 485-490.
- Futaki, M., T. Igarashi, et al. (2002). "The FANCG Fanconi anemia protein interacts with CYP2E1: possible role in protection against oxidative DNA damage." Carcinogenesis **23**(1): 67-72.
- Gabbita, S. P., M. A. Lovell, et al. (1998). "Increased nuclear DNA oxidation in the brain in Alzheimer's disease." J Neurochem **71**(5): 2034-2040.
- Garcia-Higuera, I., Y. Kuang, et al. (1999). "Fanconi anemia proteins FANCA, FANCC, and FANCG/XRCC9 interact in a functional nuclear complex." Mol Cell Biol **19**(7): 4866-4873.
- Garcia-Higuera, I., T. Taniguchi, et al. (2001). "Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway." Mol Cell **7**(2): 249-262.
- Gatz, M., N. L. Pedersen, et al. (1997). "Heritability for Alzheimer's disease: the study of dementia in Swedish twins." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **52**(2): M117-125.

- Giaccia, A. J. and M. B. Kastan (1998). "The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals." Genes Dev **12**(19): 2973-2983.
- Glickman, M. H. and A. Ciechanover (2002). "The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction." Physiol Rev **82**(2): 373-428.
- Goate, A., M. C. Chartier-Harlin, et al. (1991). "Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease." Nature **349**(6311): 704-706.
- Golden, T. R., D. A. Hinerfeld, et al. (2002). "Oxidative stress and aging: beyond correlation." Aging Cell **1**(2): 117-123.
- Gordon, S. M. and M. Buchwald (2003). "Fanconi anemia protein complex: mapping protein interactions in the yeast 2- and 3-hybrid systems." Blood **102**(1): 136-141.
- Grollman, A. P. and M. Moriya (1993). "Mutagenesis by 8-oxoguanine: an enemy within." Trends Genet **9**(7): 246-249.
- Gu, Y., C. W. Turck, et al. (1993). "Inhibition of CDK2 activity in vivo by an associated 20K regulatory subunit." Nature **366**(6456): 707-710.
- Guo, Z., R. Deshpande, et al. (2010). "ATM activation in the presence of oxidative stress." Cell Cycle **9**(24): 4805-4811.
- Haines, J. L. (1991). "The genetics of Alzheimer disease--a teasing problem." Am J Hum Genet **48**(6): 1021-1025.
- Halliwell, B. and J. M. Gutteridge (1988). "Free radicals and antioxidant protection: mechanisms and significance in toxicology and disease." Hum Toxicol **7**(1): 7-13.
- Hamilton, M. L., H. Van Remmen, et al. (2001). "Does oxidative damage to DNA increase with age?" Proc Natl Acad Sci U S A **98**(18): 10469-10474.
- Harley, C. B., A. B. Futcher, et al. (1990). "Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts." Nature **345**(6274): 458-460.
- Harman, D. (1956). "Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry." J Gerontol **11**(3): 298-300.
- Harman, D. (1981). "The aging process." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(11): 7124-7128.

- Harper, J. W., G. R. Adami, et al. (1993). "The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases." Cell **75**(4): 805-816.
- Hastie, N. D., M. Dempster, et al. (1990). "Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing." Nature **346**(6287): 866-868.
- Hatahet, Z., A. A. Purmal, et al. (1994). "Oxidative DNA lesions as blocks to in vitro transcription by phage T7 RNA polymerase." Ann N Y Acad Sci **726**: 346-348.
- Hayakawa, H., A. Taketomi, et al. (1995). "Generation and elimination of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate, a mutagenic substrate for DNA synthesis, in human cells." Biochemistry **34**(1): 89-95.
- Hazane, F., S. Sauvaigo, et al. (2006). "Age-dependent DNA repair and cell cycle distribution of human skin fibroblasts in response to UVA irradiation." J Photochem Photobiol B **82**(3): 214-223.
- Helleday, T. (2003). "Pathways for mitotic homologous recombination in mammalian cells." Mutat Res **532**(1-2): 103-115.
- Hinz, J. M., P. B. Nham, et al. (2007). "Disparate contributions of the Fanconi anemia pathway and homologous recombination in preventing spontaneous mutagenesis." Nucleic Acids Res **35**(11): 3733-3740.
- Hirai, K., G. Aliev, et al. (2001). "Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease." J Neurosci **21**(9): 3017-3023.
- Ho, C. C., W. Y. Siu, et al. (2006). "Stalled replication induces p53 accumulation through distinct mechanisms from DNA damage checkpoint pathways." Cancer Res **66**(4): 2233-2241.
- 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): 800-805.
- Howlett, N. G., T. Taniguchi, et al. (2002). "Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia." Science **297**(5581): 606-609.
- Hussain, S., J. B. Wilson, et al. (2006). "Tetratricopeptide-motif-mediated interaction of FANCG with recombination proteins XRCC3 and BRCA2." DNA Repair (Amst) **5**(5): 629-640.
- Imlay, J. A., S. M. Chin, et al. (1988). "Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro." Science **240**(4852): 640-642.

- Inoue, T., J. Stuart, et al. (2002). "Nuclear import and export signals in control of the p53-related protein p73." J Biol Chem **277**(17): 15053-15060.
- Isaacs, A. M., D. B. Senn, et al. (2006). "Acceleration of amyloid beta-peptide aggregation by physiological concentrations of calcium." J Biol Chem **281**(38): 27916-27923.
- Ishibashi, T., H. Hayakawa, et al. (2005). "Mammalian enzymes for preventing transcriptional errors caused by oxidative damage." Nucleic Acids Res **33**(12): 3779-3784.
- Ivancsits, S., E. Diem, et al. (2003). "Age-related effects on induction of DNA strand breaks by intermittent exposure to electromagnetic fields." Mech Ageing Dev **124**(7): 847-850.
- Joenje, H. (1989). "Genetic toxicology of oxygen." Mutat Res **219**(4): 193-208.
- Jung, Y. S., Y. Qian, et al. (2010). "Examination of the expanding pathways for the regulation of p21 expression and activity." Cell Signal **22**(7): 1003-1012.
- Kadioglu, E., S. Sardas, et al. (2004). "Detection of oxidative DNA damage in lymphocytes of patients with Alzheimer's disease." Biomarkers **9**(2): 203-209.
- Kaiser, T. N., A. Lojewski, et al. (1982). "Flow cytometric characterization of the response of Fanconi's anemia cells to mitomycin C treatment." Cytometry **2**(5): 291-297.
- Kim, H. S., J. H. Lee, et al. (2002). "Amyloid beta peptide induces cytochrome C release from isolated mitochondria." Neuroreport **13**(15): 1989-1993.
- Klein, J. A. and S. L. Ackerman (2003). "Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration." J Clin Invest **111**(6): 785-793.
- 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): 3341-3348.
- Kupfer, G. M., D. Naf, et al. (1997). "The Fanconi anaemia proteins, FAA and FAC, interact to form a nuclear complex." Nat Genet **17**(4): 487-490.
- 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): 3922-3927.
- Lanni, C., M. Racchi, et al. (2008). "Conformationally altered p53: a novel Alzheimer's disease marker?" Mol Psychiatry **13**(6): 641-647.

- Lavin, M. F. and S. Kozlov (2007). "ATM activation and DNA damage response." Cell Cycle **6**(8): 931-942.
- Lempiainen, H. and T. D. Halazonetis (2009). "Emerging common themes in regulation of PIKKs and PI3Ks." Embo J **28**(20): 3067-3073.
- Leutner, S., K. Schindowski, et al. (2005). "Enhanced ROS-generation in lymphocytes from Alzheimer's patients." Pharmacopsychiatry **38**(6): 312-315.
- Levine, A. J. and M. Oren (2009). "The first 30 years of p53: growing ever more complex." Nat Rev Cancer **9**(10): 749-758.
- Levitus, M., H. Joenje, et al. (2006). "The Fanconi anemia pathway of genomic maintenance." Cell Oncol **28**(1-2): 3-29.
- Levy-Lahad, E., E. M. Wijsman, et al. (1995). "A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1." Science **269**(5226): 970-973.
- Li, A. and J. J. Blow (2001). "The origin of CDK regulation." Nat Cell Biol **3**(8): E182-184.
- Li, J. C. and E. Kaminskas (1985). "Deficient repair of DNA lesions in Alzheimer's disease fibroblasts." Biochem Biophys Res Commun **129**(3): 733-738.
- 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): 3632-3637.
- Li, R., S. Waga, et al. (1994). "Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair." Nature **371**(6497): 534-537.
- Lindahl, T. (1993). "Instability and decay of the primary structure of DNA." Nature **362**(6422): 709-715.
- Lindquist, S. and E. A. Craig (1988). "The heat-shock proteins." Annu Rev Genet **22**: 631-677.
- Liu, Y., H. I. Kao, et al. (2004). "Flap endonuclease 1: a central component of DNA metabolism." Annu Rev Biochem **73**: 589-615.
- Lou, Z. and J. Chen (2006). "Cellular senescence and DNA repair." Exp Cell Res **312**(14): 2641-2646.

- Lovejoy, C. A. and D. Cortez (2009). "Common mechanisms of PIKK regulation." DNA Repair (Amst) **8**(9): 1004-1008.
- Lovell, M. A., S. P. Gabbita, et al. (1999). "Increased DNA oxidation and decreased levels of repair products in Alzheimer's disease ventricular CSF." J Neurochem **72**(2): 771-776.
- Macleod, K. F., N. Sherry, et al. (1995). "p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage." Genes Dev **9**(8): 935-944.
- Maki, H. and M. Sekiguchi (1992). "MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis." Nature **355**(6357): 273-275.
- Matsuoka, S., B. A. Ballif, et al. (2007). "ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage." Science **316**(5828): 1160-1166.
- Mattson, M. P. (2003). "Gene-diet interactions in brain aging and neurodegenerative disorders." Ann Intern Med **139**(5 Pt 2): 441-444.
- McDougal, J. N. and J. L. Jurgens-Whitehead (2001). "Short-Term dermal absorption and penetration of chemicals from aqueous solutions: theory and experiment." Risk Anal **21**(4): 719-726.
- Meetei, A. R., J. P. de Winter, et al. (2003). "A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia." Nat Genet **35**(2): 165-170.
- Mi, J., F. Qiao, et al. (2004). "FANCG is phosphorylated at serines 383 and 387 during mitosis." Mol Cell Biol **24**(19): 8576-8585.
- Migliore, L. and F. Coppede (2002). "Genetic and environmental factors in cancer and neurodegenerative diseases." Mutat Res **512**(2-3): 135-153.
- Migliore, L., I. Fontana, et al. (2005). "Oxidative DNA damage in peripheral leukocytes of mild cognitive impairment and AD patients." Neurobiol Aging **26**(5): 567-573.
- Miller, D. M., G. R. Buettner, et al. (1990). "Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions." Free Radic Biol Med **8**(1): 95-108.
- 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): 180-190.
- Moldovan, G. L. and A. D. D'Andrea (2009). "How the fanconi anemia pathway guards the genome." Annu Rev Genet **43**: 223-249.

- Morocz, M., J. Kalman, et al. (2002). "Elevated levels of oxidative DNA damage in lymphocytes from patients with Alzheimer's disease." Neurobiol Aging **23**(1): 47-53.
- Mosner, J., T. Mummenbrauer, et al. (1995). "Negative feedback regulation of wild-type p53 biosynthesis." Embo J **14**(18): 4442-4449.
- Naf, D., G. M. Kupfer, et al. (1998). "Functional activity of the fanconi anemia protein FAA requires FAC binding and nuclear localization." Mol Cell Biol **18**(10): 5952-5960.
- Nakabeppu, Y. (2001). "Molecular genetics and structural biology of human MutT homolog, MTH1." Mutat Res **477**(1-2): 59-70.
- Negritto, M. C., J. Qiu, et al. (2001). "Novel function of Rad27 (FEN-1) in restricting short-sequence recombination." Mol Cell Biol **21**(7): 2349-2358.
- Ni, T. T., G. T. Marsischky, et al. (1999). "MSH2 and MSH6 are required for removal of adenine misincorporated opposite 8-oxo-guanine in *S. cerevisiae*." Mol Cell **4**(3): 439-444.
- Nicoll, J. A., G. W. Roberts, et al. (1996). "Amyloid beta-protein, APOE genotype and head injury." Ann N Y Acad Sci **777**: 271-275.
- Nijnik, A., L. Woodbine, et al. (2007). "DNA repair is limiting for haematopoietic stem cells during ageing." Nature **447**(7145): 686-690.
- Nuttall, S. L., F. Dunne, et al. (1999). "Age-independent oxidative stress in elderly patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus." Qjm **92**(1): 33-38.
- Oda, H., Y. Nakabeppu, et al. (1997). "Regulation of expression of the human MTH1 gene encoding 8-oxo-dGTPase. Alternative splicing of transcription products." J Biol Chem **272**(28): 17843-17850.
- Oddo, S. (2008). "The ubiquitin-proteasome system in Alzheimer's disease." J Cell Mol Med **12**(2): 363-373.
- Ohyagi, Y., H. Asahara, et al. (2005). "Intracellular Abeta42 activates p53 promoter: a pathway to neurodegeneration in Alzheimer's disease." FASEB J **19**(2): 255-257.
- Oku, T., S. Ikeda, et al. (1998). "Functional sites of human PCNA which interact with p21 (Cip1/Waf1), DNA polymerase delta and replication factor C." Genes Cells **3**(6): 357-369.
- Oren, M. and V. Rotter (1999). "Introduction: p53--the first twenty years." Cell Mol Life Sci **55**(1): 9-11.

- Outeiro, T. F. and J. Tetzlaff (2007). "Mechanisms of disease II: cellular protein quality control." Semin Pediatr Neurol **14**(1): 15-25.
- Pagano, G. and H. Youssoufian (2003). "Fanconi anaemia proteins: major roles in cell protection against oxidative damage." Bioessays **25**(6): 589-595.
- Pages, V. and R. P. Fuchs (2002). "How DNA lesions are turned into mutations within cells?" Oncogene **21**(58): 8957-8966.
- Parenteau, J. and R. J. Wellinger (1999). "Accumulation of single-stranded DNA and destabilization of telomeric repeats in yeast mutant strains carrying a deletion of RAD27." Mol Cell Biol **19**(6): 4143-4152.
- Parrinello, S., E. Samper, et al. (2003). "Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts." Nat Cell Biol **5**(8): 741-747.
- Pereg, Y., S. Lam, et al. (2006). "Differential roles of ATM- and Chk2-mediated phosphorylations of Hdmx in response to DNA damage." Mol Cell Biol **26**(18): 6819-6831.
- Pereg, Y., D. Shkedy, et al. (2005). "Phosphorylation of Hdmx mediates its Hdm2- and ATM-dependent degradation in response to DNA damage." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(14): 5056-5061.
- Perry, G., A. Nunomura, et al. (2003). "A metabolic basis for Alzheimer disease." Neurochem Res **28**(10): 1549-1552.
- Pervan, M., K. S. Iwamoto, et al. (2005). "Proteasome structures affected by ionizing radiation." Mol Cancer Res **3**(7): 381-390.
- Pfaffl, M. W., G. W. Horgan, et al. (2002). "Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR." Nucleic Acids Res **30**(9): e36.
- Podust, V. N., L. M. Podust, et al. (1995). "Mechanism of inhibition of proliferating cell nuclear antigen-dependent DNA synthesis by the cyclin-dependent kinase inhibitor p21." Biochemistry **34**(27): 8869-8875.
- Prives, C. and P. A. Hall (1999). "The p53 pathway." J Pathol **187**(1): 112-126.
- Reich, N. C. and A. J. Levine (1984). "Growth regulation of a cellular tumour antigen, p53, in nontransformed cells." Nature **308**(5955): 199-201.

- Reinheckel, T., N. Sitte, et al. (1998). "Comparative resistance of the 20S and 26S proteasome to oxidative stress." Biochem J **335** (Pt 3): 637-642.
- Rivera-Munoz, P., L. Malivert, et al. (2007). "DNA repair and the immune system: From V(D)J recombination to aging lymphocytes." Eur J Immunol **37** Suppl 1: S71-82.
- Robison, S. H., J. S. Munzer, et al. (1987). "Alzheimer's disease cells exhibit defective repair of alkylating agent-induced DNA damage." Ann Neurol **21**(3): 250-258.
- Rossi, D. J., D. Bryder, et al. (2007). "Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age." Nature **447**(7145): 725-729.
- Sagara, Y., R. Dargusch, et al. (1996). "Increased antioxidant enzyme activity in amyloid beta protein-resistant cells." J Neurosci **16**(2): 497-505.
- Saha, A., S. Adak, et al. (2005). "Enhanced oxygen releasing capacity and oxidative stress in diabetes mellitus and diabetes mellitus-associated cardiovascular disease: a comparative study." Clin Chim Acta **361**(1-2): 141-149.
- Sancar, A. and J. T. Reardon (2004). "Nucleotide excision repair in E. coli and man." Adv Protein Chem **69**: 43-71.
- Sekiguchi, M. (1996). "MutT-related error avoidance mechanism for DNA synthesis." Genes Cells **1**(2): 139-145.
- Shackelford, R. E., W. K. Kaufmann, et al. (2000). "Oxidative stress and cell cycle checkpoint function." Free Radic Biol Med **28**(9): 1387-1404.
- Sharma, S., M. Otterlei, et al. (2004). "WRN helicase and FEN-1 form a complex upon replication arrest and together process branchmigrating DNA structures associated with the replication fork." Mol Biol Cell **15**(2): 734-750.
- Sheaff, R. J., J. D. Singer, et al. (2000). "Proteasomal turnover of p21Cip1 does not require p21Cip1 ubiquitination." Mol Cell **5**(2): 403-410.
- 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): 754-760.
- Shiloh, Y. (2003). "ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity." Nat Rev Cancer **3**(3): 155-168.
- Shiotani, B. and L. Zou (2009). "Single-stranded DNA orchestrates an ATM-to-ATR switch at DNA breaks." Mol Cell **33**(5): 547-558.

- Smith, J., L. M. Tho, et al. (2010). "The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer." Adv Cancer Res **108**: 73-112.
- Smith, M. A., P. L. Richey Harris, et al. (1997). "Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease." J Neurosci **17**(8): 2653-2657.
- Smogorzewska, A., S. Matsuoka, et al. (2007). "Identification of the FANCI protein, a monoubiquitinated FANCD2 paralog required for DNA repair." Cell **129**(2): 289-301.
- Song, S. and Y. K. Jung (2004). "Alzheimer's disease meets the ubiquitin-proteasome system." Trends Mol Med **10**(11): 565-570.
- Song, X. N., L. Q. Zhang, et al. (2011). "Oxidative Damage to RNA and Expression Patterns of MTH1 in the Hippocampi of Senescence-Accelerated SAMP8 Mice and Alzheimer's Disease Patients." Neurochem Res.
- Spruck, C. H. and H. M. Strohmaier (2002). "Seek and destroy: SCF ubiquitin ligases in mammalian cell cycle control." Cell Cycle **1**(4): 250-254.
- Sramek, J. J. and N. R. Cutler (1999). "Recent developments in the drug treatment of Alzheimer's disease." Drugs Aging **14**(5): 359-373.
- Subba Rao, K. (2007). "Mechanisms of disease: DNA repair defects and neurological disease." Nat Clin Pract Neurol **3**(3): 162-172.
- Tajiri, T., H. Maki, et al. (1995). "Functional cooperation of MutT, MutM and MutY proteins in preventing mutations caused by spontaneous oxidation of guanine nucleotide in Escherichia coli." Mutat Res **336**(3): 257-267.
- Taniguchi, T., I. Garcia-Higuera, et al. (2002). "S-phase-specific interaction of the Fanconi anemia protein, FANCD2, with BRCA1 and RAD51." Blood **100**(7): 2414-2420.
- Tanzi, R., S. Gaston, et al. (1993). "Genetic heterogeneity of gene defects responsible for familial Alzheimer disease." Genetica **91**(1-3): 255-263.
- Teebor, G. W., R. J. Boorstein, et al. (1988). "The repairability of oxidative free radical mediated damage to DNA: a review." Int J Radiat Biol **54**(2): 131-150.
- Thomas, T., G. Thomas, et al. (1996). "beta-Amyloid-mediated vasoactivity and vascular endothelial damage." Nature **380**(6570): 168-171.
- Thompson, L. H. and D. Schild (2001). "Homologous recombinational repair of DNA ensures mammalian chromosome stability." Mutat Res **477**(1-2): 131-153.

- Tibbetts, R. S., K. M. Brumbaugh, et al. (1999). "A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53." Genes Dev **13**(2): 152-157.
- Tsutakawa, S. E., S. Classen, et al. (2011). "Human flap endonuclease structures, DNA double-base flipping, and a unified understanding of the FEN1 superfamily." Cell **145**(2): 198-211.
- Uberti, D., T. Carsana, et al. (2002). "Selective impairment of p53-mediated cell death in fibroblasts from sporadic Alzheimer's disease patients." J Cell Sci **115**(Pt 15): 3131-3138.
- Valentine, J. S. and P. J. Hart (2003). "Misfolded CuZnSOD and amyotrophic lateral sclerosis." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(7): 3617-3622.
- Valko, M., D. Leibfritz, et al. (2007). "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." Int J Biochem Cell Biol **39**(1): 44-84.
- Waga, S. and B. Stillman (1998). "Cyclin-dependent kinase inhibitor p21 modulates the DNA primer-template recognition complex." Mol Cell Biol **18**(7): 4177-4187.
- Waisfisz, Q., J. P. de Winter, et al. (1999). "A physical complex of the Fanconi anemia proteins FANCG/XRCC9 and FANCA." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(18): 10320-10325.
- Wallace, S. S. (2002). "Biological consequences of free radical-damaged DNA bases." Free Radic Biol Med **33**(1): 1-14.
- Walter, C. A., D. T. Grabowski, et al. (1997). "Analysis and modulation of DNA repair in aging." Mech Ageing Dev **98**(3): 203-222.
- Wang, J., W. R. Markesbery, et al. (2006). "Increased oxidative damage in nuclear and mitochondrial DNA in mild cognitive impairment." J Neurochem **96**(3): 825-832.
- Weissman, I. L. (2000). "Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution." Cell **100**(1): 157-168.
- Wilson, J. B., K. Yamamoto, et al. (2008). "FANCG promotes formation of a newly identified protein complex containing BRCA2, FANCD2 and XRCC3." Oncogene **27**(26): 3641-3652.
- Wyss-Coray, T. and L. Mucke (2002). "Inflammation in neurodegenerative disease--a double-edged sword." Neuron **35**(3): 419-432.

- Xiong, Y., G. J. Hannon, et al. (1993). "p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases." Nature **366**(6456): 701-704.
- Yang, J. L., L. Weissman, et al. (2008). "Mitochondrial DNA damage and repair in neurodegenerative disorders." DNA Repair (Amst) **7**(7): 1110-1120.
- Yee, K. S. and K. H. Vousden (2005). "Complicating the complexity of p53." Carcinogenesis **26**(8): 1317-1322.
- Zhang, X. and P. W. Majerus (1998). "Phosphatidylinositol signalling reactions." Semin Cell Dev Biol **9**(2): 153-160.
- Zharkov, D. O., T. A. Rosenquist, et al. (2000). "Substrate specificity and reaction mechanism of murine 8-oxoguanine-DNA glycosylase." J Biol Chem **275**(37): 28607-28617.
- Zhou, X. and J. Jia (2010). "P53-mediated G(1)/S checkpoint dysfunction in lymphocytes from Alzheimer's disease patients." Neurosci Lett **468**(3): 320-325.
- Zou, L. (2007). "Single- and double-stranded DNA: building a trigger of ATR-mediated DNA damage response." Genes Dev **21**(8): 879-885.

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

Campus Universitário Monte Alegre - Fone: 633-1000 - Fax: 633-1144
CEP 14048-900 RIBEIRÃO PRETO - SÃO PAULO

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – PACIENTES

NOME DA PESQUISA: AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DOS MECANISMOS DE REPARO DO DNA DOS LINFÓCITOS DE IDOSOS PORTADORES DA DOENÇA DE ALZHEIMER, IDOSOS SADIOS E JOVENS.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Giovana da Silva Leandro

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 da Universidade de São Paulo (FMRP/USP).
Telefone : (16) 3602-3082

Convidamos o senhor(a) a participar do projeto de pesquisa intitulado: AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DOS MECANISMOS DE REPARO DO DNA DOS LINFÓCITOS DE IDOSOS PORTADORES DA DOENÇA DE ALZHEIMER, IDOSOS SADIOS E JOVENS.

A pesquisa será realizada pela bióloga pós-graduanda em nível de mestrado, Giovana da Silva Leandro, aluna do Departamento de Genética, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, que realizará um estudo sobre a Doença de Alzheimer. Trata-se de uma doença em que os neurônios aos poucos vão morrendo, afetando a memória dos portadores, o que os leva a dependência da família. Este estudo tem como finalidade a compreensão das causas que podem levar ao desenvolvimento da doença. As células presentes no sangue colhido serão submetidas a uma série de testes capazes de detectar alterações no material genético, na tentativa de encontrar fatores em comum nos pacientes de Alzheimer e diferenciá-los dos indivíduos sadios. Assim, esperamos conseguir resultados que possam contribuir para o entendimento da doença, embora o presente estudo não deva beneficiar diretamente os participantes.

Assim, para a realização desta pesquisa, é necessária a coleta de 20 ml de sangue periférico (equivalente a cerca de duas colheres de sopa), por punção venosa que será feita somente quando o paciente comparecer ao ambulatório para os exames rotineiros 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:

- 1) O voluntário terá a garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos e benefícios e outros relacionados com a pesquisa;

- 2) Terá a liberdade de retirar o consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo sem que isso traga algum prejuízo ou constrangimento;
- 3) Será mantido o compromisso de que o voluntário não será identificado, sendo que a participação terá caráter confidencial;
- 4) Será mantido o compromisso de proporcionar informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar a vontade de continuar participando;
- 5) 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 e impor um risco mínimo, mas apenas pela “picada” com a agulha;
- 6) 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.
- 7) Caso haja algum gasto adicional, este ocorrerá por conta do pesquisador.

Para esclarecer quaisquer dúvidas, telefonar para (16) 3602-3082 ou 3602-3827 e falar com Giovana S. L. (pós-graduanda) ou com a Professora Elza T. Sakamoto Hojo (orientadora da aluna). Endereço: Departamento de Genética, bloco G, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; Av Bandeirantes 3900, 14040-901 Ribeirão Preto, SP.

Tendo ciência do exposto acima, assino abaixo.

Giovana da Silva Leandro

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

Relação do responsável com o paciente: _____

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 20

Assinatura do voluntário

Assinatura do responsável

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

Campus Universitário Monte Alegre - Fone: 633-1000 - Fax: 633-1144
CEP 14048-900 RIBEIRÃO PRETO - SÃO PAULO

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – CONTROLES

NOME DA PESQUISA: AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DOS MECANISMOS DE REPARO DO DNA DOS LINFÓCITOS DE IDOSOS PORTADORES DA DOENÇA DE ALZHEIMER, IDOSOS SADIOS E JOVENS.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Giovana da Silva Leandro

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 da Universidade de São Paulo (FMRP/USP).
Telefone : (16) 3602-3082

Convidamos o senhor(a) a participar do projeto de pesquisa intitulado: AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DOS MECANISMOS DE REPARO DO DNA DOS LINFÓCITOS DE IDOSOS PORTADORES DA DOENÇA DE ALZHEIMER, IDOSOS SADIOS E JOVENS.

A pesquisa será realizada pela bióloga pós-graduanda em nível de mestrado, Giovana da Silva Leandro, aluna do Departamento de Genética, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, que realizará um estudo sobre a Doença de Alzheimer. Trata-se de uma doença em que os neurônios aos poucos vão morrendo, afetando a memória dos portadores, o que os leva a dependência da família. Este estudo tem como finalidade a compreensão das causas que podem levar ao desenvolvimento da doença. As células presentes no sangue colhido serão submetidas a uma série de testes capazes de detectar alterações no material genético, na tentativa de encontrar fatores em comum nos pacientes de Alzheimer e diferenciá-los dos indivíduos sadios. Assim, esperamos conseguir resultados que possam contribuir para o entendimento da doença, embora o presente estudo não deva beneficiar diretamente os participantes.

Para a realização desta pesquisa é necessária a participação de pessoas sadias 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 sadio, a pesquisadora 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 duas colheres de sopa), por punção venosa, que será feita por um profissional habilitado e altamente capacitado nessa atividade.

Serão preservados os direitos do doador, conforme seguem:

1) O voluntário terá a garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos e benefícios e outros relacionados com a pesquisa;

- 2) Terá a liberdade de retirar o consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo sem que isso traga algum prejuízo ou constrangimento;
- 3) Será mantido o compromisso de que o voluntário não será identificado, sendo que a participação terá caráter confidencial;
- 4) Será mantido o compromisso de proporcionar informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar a vontade de continuar participando;
- 5) 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 e impor um risco mínimo, mas apenas pela “picada” com a agulha;
- 6) 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.
- 7) Caso haja algum gasto adicional, este ocorrerá por conta do pesquisador.

Para esclarecer quaisquer dúvidas, telefonar para (16) 3602-3082 ou 3602-3827 e falar com Giovana S. L. (pós-graduanda) ou com a Professora Elza T. Sakamoto Hojo (orientadora da aluna).
Endereço: Departamento de Genética, bloco G, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; Avenida Bandeirantes 3900, 14040-901 Ribeirão Preto, SP.

Tendo ciência do exposto acima, assino abaixo.

Giovana da Silva Leandro

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

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

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

www.hcrp.usp.br

Ribeirão Preto, 10 de dezembro de 2009

Ofício nº 4172/2009
CEP/MGV**Prezadas Senhoras,**

O trabalho intitulado **“AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DOS MECANISMOS DE REPARO DO DNA DOS LINFÓCITOS DE IDOSOS PORTADORES DA DOENÇA DE ALZHEIMER, IDOSOS SADIOS E JOVENS”** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 300ª Reunião Ordinária realizada em 07/12/2009 e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 10374/2009.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimas Senhoras

GIOVANA DA SILVA LEANDRO**PROFª DRª ELZA T. SAKAMOTO HOJO (Orientadora)**

Depto. de Genética – FMRP-USP