Maria Carolina Pedro Athié

Análise da expressão gênica e proteômica em
pacientes com doença de Alzheimer: busca de
marcadores periféricos

Genetic and proteomic expression analysis in
patients with
Alzheimer's disease: search for peripheral
biomarkers.

São Paulo
2010

Maria Carolina Pedro Athié

Análise da expressão gênica e proteômica em
pacientes com doença de Alzheimer: busca de
marcadores periféricos

Genetic and proteomic expression analysis in
patients with
Alzheimer's disease: search for peripheral
biomarkers.

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biociências da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Mestre em Biologia, na Área de
Genética.

Orientador (a): Elida Benquique Ojopi

São Paulo

2010

Athié, Maria Carolina Pedro

Análise da expressão gênica e proteômica em
pacientes com doença de Alzheimer: busca de
marcadores periféricos

148 páginas

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo. Departamento de Genética
e Biologia Evolutiva.

1. Doença de Alzheimer 2. Biomarcadores Periféricos
3. Expressão gênica e protéica
I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências.
Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr.(a).

Orientador(a)

Dedicatória

*À minha família, por todo apoio
e compreensão.*

Agradecimentos

Agradeço à Dra. Elida Ojopi, minha orientadora, pela atenção, competência, confiança e pelos valiosos ensinamentos durante essa árdua empreitada. Aprendi muito com você! Obrigada pelo respeito e carinho!

À André S. Vieira, mais que um companheiro, peça essencial para o funcionamento desta engrenagem. Você foi imprescindível para a realização deste projeto.

Aos meus pais, José Roberto e Regina, meus super avós, Odete e Abel, e meus irmãos Paula, César e meu cunhado preferido, Maurício, pelo carinho, loucura, desordem e bagunça essencial para que a minha cabeça se mantivesse em ordem.

Às minhas grandes amigas e (coincidentemente) colegas de laboratório Vanessa, um modelo de pesquisadora exemplar (quando crescer quero ser que nem você!), Helena, a racionalidade em pessoa, mas que de vez em quando deixa transparecer um pouco do seu lado sensível (sem você, a sanidade não chegaria ao laboratório!). Carolina do Prado, às vezes filha, às vezes mãe, mas sempre presente e torcendo por nós! À Karisa, Eliza e Aline pela companhia e conversas divertidas para alegrar o ambiente. À Sandra, por sua jovialidade e alegria no Laboratório! À Dona Edivani, membro essencial do LIM-27, parte deste citoesqueleto, sem sua alegria (e seus cafés), não haveria pesquisa! Ao Julien, Giselle e Carol Torres, meus colegas de laboratório e de risadas, e às vezes de lambanças sem-querer! E por fim, mas não menos importante, à Leda, mãe de todos nós, mas muito mais que isso, não só um ombro, uma co-orientadora nata! Obrigada pelas dicas, conselhos e contribuições essenciais para essa dissertação e para todo resto.

Aos meus amigos e colegas de laboratórios durante o tempo em que fiquei em Campinas, em especial ao Erich, que sem pestanejar não só me ensinou os fundamentos e técnicas de Gel 2D, mas também ficou pacientemente ao meu lado me ajudando a executar os procedimentos enquanto (ao mesmo tempo) escrevia a sua tese! Obrigada de coração! À Rafinha, Janice,

Elayne, Dionéia, Gustavo, Karina, César e Alexandre pela companhia e risadas, e por desanuviar a minha cabeça quando preciso!

Aos meninos da República do Matão, Renato, Pablo, Shin e Pedro, por oferecerem uma estadia 5 estrelas em meu período em Campinas, além de suas amizades.

Aos meus amigos de faculdade Déde, Bugia, Fefs, Patty, Gu Shimizu, Japa e Pallocci pela torcida e pensamentos positivos.

Às amigas-irmãs Grace, Carol e Dê que cresceram comigo e me conhecem melhor do que ninguém. Sempre estaremos juntas!

À eterna Jungle! Obrigada por fazerem parte da minha vida!

Aos professores Francesco Langoni (*in memoriam*) e José Camilo Novello, coordenadores dos laboratórios de Neurobiologia e Proteoma do Instituto de Biologia da UNICAMP, por terem me proporcionado a oportunidade de aprender sobre o mundo mágico das proteínas e desenvolver o trabalho em seus laboratórios. O carinho e dedicação de vocês nunca serão esquecidos.

Ao Dr. Ivan e Dr. Breno, pela colaboração neste projeto.

Às Dras. Adriana Paes Leme e Thaís Caroline Dombroski pelo auxílio e disponibilidade na utilização do Espectrômetro de Massas do Laboratório Nacional de Luz Sincrotron.

À Deisy, secretária da genética mais simpática que eu conheci. Você foi uma mãezinha!

Ao Professor Wagner Farid Gattaz, pela oportunidade de desfrutar e desenvolver o projeto no laboratório.

À FAPESP, CNPq e Abadhs pelo financiamento do projeto.

E às Universidade de São Paulo e Universidade Estadual de Campinas pela estrutura oferecida, sem as quais esse projeto não poderia ser realizado.

Índice

I – Introdução

1 – Panorama mundial	10
2 – Demência	10
3 – Doença de Alzheimer	12
3.1 – Patologia da DA	13
3.1.1 – Metabolismo e função de A β	16
3.1.2 – Metabolismo e função da TAU	18
3.2 – Patogênese da DA	20
3.3 – A Genética da DA	22
3.4 – Fatores de risco	26
3.5 – Diagnóstico	27
4 – Biomarcadores	28
4.1 – Prospecção de biomarcadores na DA	29
5 – Biomarcadores de expressão	33

II – Objetivos

1 – Objetivo geral	36
2 – Objetivos específicos	36

III – Material e Métodos

1 – Obtenção de dados da literatura	37
2 – Casuística	38
2.1 – Caracterização das amostras utilizadas para o estudo de expressão gênica em leucócitos	39
2.2 – Caracterização das amostras utilizadas para o estudo de perfil protéico de plaquetas	41
3 – Estudos de expressão gênica de leucócitos	45
3.1 – Padronização da extração de RNA de leucócitos de sangue periférico	45
3.2 – Integridade e quantificação do RNA	46

3.3 – Tratamento do RNA total por digestão enzimática de DNase	46
3.4 – Síntese da fita complementar (cDNA) a partir de RNA total após digestão com DNases	47
3.5 – PCR convencional para o gene Glucuronidase Beta (<i>GUSB</i>)	48
3.6 – PCR em tempo-real	49
3.7 – Análise dos Dados	50
4 – Estudo de Proteômica de plaquetas	51
4.1 – Padronização da extração de Proteínas de Plaquetas	51
4.2 – Integridade e quantificação das proteínas	52
4.3 – Eletroforese Bidimensional (Gel 2-DE)	53
4.3.1 – Foco Isoelétrico	53
4.3.2 – Gel SDS-PAGE	54
4.3.3 – Coloração com Coomassie Blue Coloidal	55
4.3.4 – Análise da expressão protéica de géis corados com Coomassie Blue Coloidal	55
4.4 – Identificação das proteínas diferencialmente expressas	55
4.4.1 – Digestão protéica pela enzima Tripsina	55
4.4.2 – Identificação dos fragmentos peptídicos por espectrometria de massas	56

IV – Resultados

1 – Seleção de Genes diferencialmente expressos a partir da literatura	58
2 – Estudos de expressão gênica de leucócitos	63
2.1 – Padronização da técnica de extração de RNA a partir de leucócitos de sangue periférico	63
2.1.1 – Protocolo de isolamento de leucócitos por lise de hemácias	63
2.1.2 – Protocolo de isolamento de leucócitos pelo método Ficoll-Paque TM	64
2.2 – Extração de RNA de leucócitos de sangue periférico dos pacientes e controles	65
2.3 – Tratamento do RNA total por digestão enzimática de DNase	67
2.4 – Avaliação da expressão dos genes selecionados	70
2.4.1 – Curva de eficiência	70
2.4.2 – Seleção dos controles endógenos	70

2.4.3 – Análise da diferença de amplificação das amostras para os genes-alvo	72
3 – Estudo de Proteômica de plaquetas	78
3.1 – Padronização da técnica de extração de Proteínas de Plaquetas	78
3.2 – Padronização da técnica de Eletroforese Bidimensional	80
3.3 – Eletroforese Bidimensional de proteínas de Plaquetas	81
3.5 – Análise computacional das imagens	84
3.6 – Identificação das proteínas por MS	90
V – Discussão	91
1 – Busca de Genes na Literatura e Reprodutibilidade	91
2 – Estudos de expressão gênica de leucócitos	97
2.1 – Validação dos genes selecionados por PCR em tempo-real	97
2.2 – Genes diferencialmente expressos	98
2.2.1 – <i>ATP5J2</i>	98
2.2.2 – <i>KIF1B</i>	99
2.2.3 – <i>S100A4</i>	100
2.3 – Hipótese biológica: Marcadores de Inflamação e Apoptose	103
2.3.1 – Inflamação	103
2.3.2 – Apoptose	105
2.4 – Potenciais biomarcadores	107
3 – Estudo de Proteômica de plaquetas	108
VI – Conclusão	112
VII – Resumo	114
VIII – Abstract	115
IX – Referências Bibliográficas	116
X – Apêndice	146
XI – Biografia	148

I – Introdução

1 - Panorama mundial

Estima-se que a população acima dos 60 anos, hoje responsável por 10% da população mundial, irá contribuir em 2050 com 22% dessa população, em consequência do aumento da expectativa de vida e redução das médias de natalidade na maior parte dos países, principalmente os considerados “em desenvolvimento”. Isto significa, em números, um salto de 516 milhões de idosos em 2010 para 1,6 bilhões em 2050 (dados obtidos pelo International Database U.S. Census Bureau, 2009). Concomitantemente, prevê-se aumento na incidência de doenças típicas da terceira idade como hipertensão, diabetes e a demência. Isso irá requerer novas políticas de saúde pública, visando priorizar esta parcela da população a fim de melhorar sua qualidade de vida.

2 – Demência

Os quadros demenciais são atualmente a terceira causa de morte mais comum em idosos (Jellinger *et al.*, 2008). O Manual Diagnóstico e Estatístico de Doenças Mentais, o DSM, versão IV (Association Psychiatric Association, 1994) e o Código Internacional de Doenças atualmente em vigor no Brasil, o CID 10 (Organização Mundial da Saúde, 1997), definem estes quadros como uma síndrome de natureza crônica e progressiva com desenvolvimento de múltiplos déficits cognitivos, como comprometimento de memória, pensamento, orientação, compreensão, cálculo, linguagem e o julgamento. A etiologia mais comum dos quadros demenciais é de natureza neurodegenerativa (p.ex. doença de Alzheimer). Entretanto, eles podem ser causados por lesões vasculares, doenças endócrino-metabólicas, deficiências nutricionais e efeitos persistentes de intoxicação exógena. Dentre as doenças cujos sintomas integram a síndrome da demência, as mais freqüentes na população mundial são a doença de Alzheimer (DA), doença vascular cerebral e a demência mista, caracterizada pela associação da DA com outra doença neurodegenerativa (Alzheimer Association, 2010).

Estima-se que atualmente existam, no mundo todo, 35,5 milhões de afetados, e que em 2050, passem dos 115,5 milhões (dados obtidos pelo International Database U.S. Census Bureau, 2009). A maior parcela de afetados por esta síndrome encontra-se acima dos 65 anos (90%), havendo duplicação da prevalência a cada 5 anos após os 65 anos. Uma meta-análise de estudos de prevalência de demência em diferentes regiões do globo realizada pela organização não-governamental *Alzheimer's Disease International* constatou que a maior parte da população afetada se encontra em países desenvolvidos ou em desenvolvimento. Adicionalmente, estima-se que em 2050, os países em desenvolvimento ou subdesenvolvidos, como China, Índia, Indonésia e Brasil venham a abrigar 70% dessa população afetada (Alzheimer's Disease International, 2009). Em adição, um estudo de 2009 evidenciou que muito embora a taxa global de prevalência de demências nos países latino-americanos espelhar a dos países desenvolvidos (em torno de 7,1%), esta taxa, quando repartida entre as faixas etárias, mostra-se aumentada em grupos mais jovens (65-69 anos) comparativamente com os países desenvolvidos (Nitrini *et al.*, 2009).

Figura 1. Gráfico comparativo da prevalência de Demência em intervalos de 20 anos a partir de 2010, com indicação das porcentagens por condição econômica dos países mundiais baseada nos dados do grupo *Alzheimer's Disease International*, 2009.

Atualmente, os custos globais anuais para o tratamento da demência somam U\$ 422 bilhões (Wimo *et al.*, 2010), distribuídos de forma desproporcional entre países desenvolvidos (77% do valor total) e subdesenvolvidos (23% do valor total) (Wimo *et al.*, 2007). Os Estados Unidos, por exemplo, gastaram em 2009 U\$ 97 bilhões com o tratamento formal e informal de demência, resultando por paciente, um gasto de U\$ 26.700,00 anuais. Em contrapartida, o Continente Africano inteiro gastou em 2009 U\$ 7,9 bilhões com o tratamento de demências, o que resultou, por indivíduo, U\$ 4.400,00 anuais (Wimo *et al.*, 2010). Crê-se que esta discrepância possa indicar não somente a diferença econômica entre os dois grupos, que reflete nas pastas e orçamentos dedicados à saúde, mas também indicar outros problemas de ordem social, como avaliação diagnóstica inadequada e a ignorância sobre doença, principalmente em populações mais pobres. Isso pode levá-las a confundir ou acreditar que os sintomas da demência façam parte do processo de envelhecimento natural, não buscando apoio médico necessário para familiares e conhecidos (Raicher *et al.*, 2008). Tal desconhecimento deve-se principalmente a políticas de saúde-pública pouco eficazes no sentido de informar e divulgar sobre uma das condições mais comuns do século XXI.

3 - Doença de Alzheimer

Assim como as outras demências, a doença de Alzheimer caracteriza-se como uma doença neurodegenerativa progressiva, com declínio cognitivo e de outras funções e, ocasionalmente sintomas como agitação, mudanças de personalidade, distúrbios do humor e prostração. Esta doença acomete principalmente indivíduos na senescência, correspondendo por 60% - 80% dos casos de demência senil (Alzheimer's Association, 2010).

A prevalência da DA cresce com o aumento da idade em indivíduos idosos. Assim, após os 65 anos, a prevalência dobra; em indivíduos de 65 a 69 anos, é de 2%, duplicando para 4% em indivíduos entre 70-75 anos, 8% para indivíduos entre 75 a 79 anos, 16% para indivíduos entre 80 a 85 anos, 35 a 40% em indivíduos entre 85-95 anos, finalmente chegando a uma prevalência de 60% na décima década de vida (van der Flier e Scheltens, 2005). Mortimer e Borenstein estimaram que a incidência anual da DA se dá em 1% da população acima dos 65 anos (Mortimer e Borenstein, 2006).

Nos Estados Unidos, estudos estimam que 5,3 milhões de pessoas tenham DA, dentre estas, 5,1 milhões tenham idade acima de 60 anos (Alzheimer's Association, 2009). Ademais, o *Baby Boom* norte-americano e o aumento da expectativa de vida contribuirão para o aumento dessa população idosa. Assim, prevê-se que em 2050 haverá mais de 13 milhões de casos de DA nos EUA (Herbert *et al.*, 2003).

No Brasil, um estudo epidemiológico realizado em 2002 revelou que 7,1% da população acima de 60 anos é acometida por algum tipo de demência, e que desses, 55,1% dos pacientes apresentavam DA (Herrera *et al.*, 2002). Dados similares foram encontrados em outro estudo realizado em 2003, no qual o diagnóstico de 275 pacientes do ambulatório de demências do Hospital das Clínicas da cidade de São Paulo apontou a incidência de Doença de Alzheimer em 59,6% desses pacientes (Takada *et al.*, 2003). Em números absolutos, utilizando-se dados de incidência estabelecidos para a população mundial, estima-se que o Brasil possua 1,2 milhões de indivíduos com DA e incidência de 100 mil casos por ano (Mendes, 2008).

3.1 - Patologia da DA

Estima-se que a neurodegeneração em DA comece de vinte a trinta anos antes do surgimento dos primeiros sintomas clínicos.

Macroscopicamente, o cérebro *post-mortem* de um indivíduo idoso com DA, apesar de apresentar algumas alterações morfológicas, não pode ser diferenciado com certeza de um cérebro *post-mortem* de um indivíduo sem demência, de mesma faixa etária. Apesar disso, observa-se modesta atrofia do córtex frontotemporal associativo, alargamento simétrico dos ventrículos laterais e atrofia de hipocampo, com dilatação seletiva do corno temporal adjacente ao ventrículo lateral, dado esse considerado mais importante na diferenciação da DA de outras demências (Perl, 2010).

Figura 2. Ilustração comparativa de cérebros de um indivíduo saudável e outro com DA avançado, evidenciando as principais características morfológicas macroscópicas da doença: diminuição da camada cinzenta, diminuição de giros e alargamento de ventrículos. Fonte :National Institute of Aging- www.nia.nih.gov/Alzheimers/Resources/HighRes

Microscopicamente pode-se observar perda neuronal e sináptica principalmente em regiões do córtex e hipocampo (sobretudo nas camadas piramidais de estruturas límbicas e córtices associativos), disfunção neurovascular, processos inflamatórios, neuritos distróficos, angiopatia e as lesões características: (1) placas neuríticas (ou senis), que contêm depósitos extracelulares de proteína β -amilóide ($A\beta$), um subproduto originário de uma das vias de clivagens da Proteína precursora do Amilóide (APP) e (2) os emaranhados neurofibrilares, compostos principalmente pela Proteína Associada à Microtúbulos (MAPTAU), hiperfosforilada e localizados normalmente no citoplasma perinuclear (Scheff *et al.*, 1993; Heinonen *et al.*, 1995; Braak *et al.*, 1999). Outras inclusões como o corpúsculo de Lewy e Hirano também são freqüentes, mas não exclusivas (Perl, 2010).

Figura 3. Imuno-histoquímica para os marcadores microscópicos característicos da DA. A seta preta evidencia as placas senis e a seta vermelha os emaranhados neurofibrilares. Fonte: **Perl, 2010.**

Eva e Heiko Braak, em 1999, propuseram uma seqüência de progressão neuropatológica da doença baseada em análises minuciosas *post-mortem* de regiões cerebrais de 83 indivíduos idosos. É o chamado Estadiamento Braak & Braak. Este estadiamento separa a progressão da doença em 6 estágios, de acordo com o grau e progressão das lesões proporcionadas principalmente pelos emaranhados neurofibrilares nas diferentes regiões cerebrais. Apesar de o estadiamento ter sido feito sem associação com dados clínicos e existirem evidências de que nem todos os pacientes com DA evoluem de acordo com este critério, o Estadiamento Braak & Braak é extremamente útil para a avaliação do estágio relativo do desenvolvimento da doença e suas implicações clínicas. Nos estágios 1 e 2 há envolvimento de lesões no córtex entorrinal e hipocampo, marcando o início da doença; em associação com dados clínicos, nessa fase podem aparecer os primeiros sintomas bastante inespecíficos, como discreta redução da memória, não notável e sem comprometimento das atividades diárias. Nos estágios 3 e 4, há o envolvimento do lobo límbico e neocórtex e clinicamente nota-se prejuízo de memórias de

longo-prazo e outros processos cognitivos como julgamento, raciocínio abstrato, cálculo e habilidades visuoespaciais. Há também dificuldade em reconhecer pessoas, objetos e escolha da palavra certa para nomeá-los (anomia). Por fim, nos estágios 5 e 6, há completo envolvimento do neocórtex, e perda total da sequência lógica da fala, déficit motor, alteração do ciclo sono/vigília, agitação, irritabilidade e dependência total de um cuidador para realizar as atividades diárias. A morte ocorre de 5 a 8 anos após o aparecimento dos primeiros sintomas, e normalmente decorre de doenças oportunistas devido à debilidade imunológica do paciente (Perl, 2010).

3.1.1 - Metabolismo e função de A β

As placas senis extracelulares e a morte celular decorrente da emaranhados neurofibrilares são as características histopatológicas principais para o diagnóstico da DA. Em decorrência disso, pesquisadores voltaram os olhos para a proteína que majoritariamente as compunham, desvendando a sequência de aminoácidos de A β em meados de 1980, o que contribuiu também para, mais tarde, haver a clonagem do gene *APP* (Masters *et al.*, 1985; Kang *et al.*, 1987). APP, uma das proteínas mais abundantes do sistema nervoso central (revisto em de Paula *et al.*, 2009), pertence a uma grande família de proteínas de membrana tipo I com um longo domínio extracelular N-terminal e uma pequena região citoplasmática C-terminal cuja derivação se dá por *splicing* diferencial de um mesmo transcrito de um único gene localizado no braço longo do cromossomo 21. Existem três isoformas predominantes e tecido-específicas: APP770, APP751 e APP695. Tais isoformas são clivadas dentro do complexo golgiense por uma O-glicosilação de forma constitutiva (Hemming *et al.*, 2005; revisto em Mohandas *et al.*, 2009). Tais descobertas serviram para elucidar a função de A β no organismo, considerada como um peptídeo de função anormal. Entretanto, tal peptídeo também é produzido constitutivamente no organismo, e sua excisão de APP depende de secretases distintas, que podem ou não formá-lo. A via predominante de processamento de APP é chamada não-amiloidogênica e realizada por um complexo enzimático denominado α -secretase. Essa clivagem ocorre dentro do domínio de A β , na região extracelular N-terminal, prevenindo sua formação. O subproduto formado, o peptídeo solúvel sAPP α , é liberado para o meio

extracelular e infere-se que tenha papel na neuroproteção. O fragmento carboxi-terminal ancorado à membrana sofre uma segunda clivagem, via γ -secretase e é submetido a transporte axonal anterógrado e tem função neuroprotetora e neurotrófica na formação de sinapses (revisto em Querfurth e LaFerla; 2010). Alternativamente, pela via amiloidogênica, a APP pode ser clivada pela BACE-1 (Enzima de Clivagem 1 da Proteína Precursora do Amilóide sítio Beta) em uma região N-terminal de APP anterior ao domínio que originará A β . Assim, forma-se um peptídeo denominado sAPP β , menor do que o sAPP α , também liberado para o meio extracelular. Ancorado à membrana, permanece um peptídeo de 99 aminoácidos na região C-terminal de APP (C99). C99 é então reconhecido por outro complexo enzimático, o γ -secretase, sendo clivado e havendo a liberação do peptídeo A β . Este peptídeo pode apresentar tamanhos variados e entre os mais abundantes no cérebro estão A β 40 e A β 42 (Hemming *et al.*, 2005; revisto em Querfurth e LaFerla, 2010). Sob condições normais, 90% do peptídeo A β secretado é a isoforma A β 40, sendo esta mais solúvel e que converte em uma forma insolúvel de folha- β para que possa ser eliminado do cérebro. Em contraste a A β 42, que representa menos de 10% das isoformas secretadas, é altamente insolúvel e propensa a agregação (Zhang *et al.*, 2002), podendo ser encontrada em estágios precoces da doença em cérebro de indivíduos com DA e Síndrome de Down (revisto em Mohandas *et al.*, 2009). Os peptídeos de A β são liberados como monômeros, e na região extracelular podem se agregar em dímeros, trímeros, oligômeros, protofilamento, filamentos, finalmente depósitos originando as placas difusas e posteriormente placas maduras de amilóide (Roberts *et al.*, 1994). As formas intermediárias de A β e os oligômeros solúveis são considerados os mais neurotóxicos (Walsh e Selkoe, 2007). Os mecanismos responsáveis pela neurotoxicidade do A β são complexos, mas existem evidências de que o aumento da atividade neuronal eleve à secreção de A β contido nas células, em um processo intimamente ligado à secreção de vesículas de neurotransmissores. Fisiologicamente, imagina-se que a secreção de A β sirva como um sistema tamponante, evitando hiperexcitabilidade neuronal. Na doença, no entanto, o excesso de A β pode prejudicar a excitabilidade celular e comunicação na região de sinapses (Kamenetz *et al.*, 2003). Além disso, A β também parecem se envolver na quebra da homeostase intracelular do cálcio, potássio, indução de estresse oxidativo bem como o favorecimento de vias apoptóticas, pelo

aumento da expressão das proteínas associadas a esse fenômeno, como Proteína X Associada à BCL2 (BAX), Proteína ligante de Cálcio S-100 cadeia Beta (S100B) e redução da Proteína de célula-B /linfoma 2 (BCL2) (revisado em Blennow, 2006).

Figura 4. As duas vias de metabolismo da Proteína Precursora de Amiloide e a origem do β -amilóide Na via da α -secretase ocorre a excisão de um peptídeo pequeno, após a clivagem de APP pelas duas secretases: uma na porção N-terminal, dentro do domínio de $A\beta$, e a outra na porção intracelular C-terminal. Na via β -secretase, ocorre a excisão do peptídeo $A\beta$ após a clivagem de APP das duas secretases: uma na porção N-terminal, antes do domínio de $A\beta$, e outra na porção intracelular C-terminal. Fonte: modificado de **Querfurth e LaFerla, 2010**.

3.1.2- Metabolismo e função da TAU

Os Emaranhados neurofibrilares, que são inclusões filamentosas presentes majoritariamente em neurônios piramidais são encontrados na DA e em outras doenças neurodegenerativas chamadas Tauopatias (revisto em Querfurth e LaFerla, 2010). O componente principal destas inclusões é a Proteína Associada a Microtúbulos TAU (MAPTAU), cuja função é ligar-se aos polímeros α e β -globulina dos microtúbulos conferindo-lhes estabilidade. A interação de TAU com a tubulina é um processo dinâmico no qual a TAU promove sua própria polimerização e inibe a rápida despolimerização da tubulina (Drechsel *et al.*, 1992). Sua função é regulada pelo

estado de fosforilação e defosforilação compreendidos em 79 sítios de sua proteína, gerando mudanças conformacionais que influenciam na sua interação com as proteínas constituintes do microtúbulo. Esse processo é mediado por múltiplas quinases, como a enzima Glicogênio Sintase Quinase 3 Beta, a GSK3B (principalmente) e a Quinase Dependente de Ciclina 5, a CDK5, e contrabalanceada pelas fosfatases, como a PP-1 e PP-2 (Iqbal *et al.*, 2005). Porém, devido a disfunções em proteínas que modulam sua fosforilação, a TAU, na DA, passa a apresentar uma taxa de fosforilação maior, tornando-se hiperfosforilada seqüestrando isoformas normais, o que gera a despolimerização e desestabilização dos microtúbulos. Esses eventos levam ao comprometimento do transporte axonal, afetando a função neuronal e sináptica, além da formação de fibras e emaranhados insolúveis na região do corpo celular e posteriormente, regiões axonais e dendríticas (Iqbal *et al.*, 2005).

Figura 5. Proteína TAU nos microtúbulos do neurônio e evolução da sua agregação e desestabilização até a formação dos emaranhados neurofibrilares. Fonte: modificado de **Querfurth e LaFerla, 2010**.

3.2 - Patogênese da DA

Apesar de já se compreender muito sobre o metabolismo e a formação das lesões características da DA, pouco se sabe acerca de seu envolvimento na patogênese da doença. A rigor, diversas hipóteses foram formuladas para tentar explicar a origem da doença, dentre as quais a “Cascata Amilóide” e a “Hipótese da hiperfosforilação da TAU”, sendo estas as mais aceitas no meio científico.

A hipótese central da Cascata Amilóide preconiza que haja um desequilíbrio entre a produção e a eliminação de A β no cérebro como evento inicial, posteriormente levando à degeneração neuronal e demência (Hardy e Selkoe, 2002). O fato mais significativo que corrobora esta hipótese central é a associação positiva entre mutações e duplicações nos genes *APP* e de outras proteínas associadas ao metabolismo de A β e o aparecimento da DA em indivíduos jovens, e com síndrome de Down. Acredita-se que uma das causas do desequilíbrio seja a expressão aumentada do gene *APP*, levando a um aumento da produção de A β . Sabe-se que há aumento da expressão do *APP* proporcionada por indução de inflamação *in vitro* ou *in vivo* devido à isquemia e trauma e que este aumento leva a deposição de A β . Além disso, evidência de acúmulo de monômeros de A β intracelular em tecido cerebral humano e de ratos transgênicos associados à degeneração sináptica local apontam para o envolvimento desse peptídeo na progressão da doença (revisto em LaFerla *et al.*, 2007). A morte de neurônios, outra característica proeminente da DA foi associada aos recém-descobertos oligômeros de A β . Acredita-se que tais oligômeros, ainda intracelulares, sejam capazes de estimular a clivagem de APP pela via amiloidogênica e quando liberados da célula, estimulem as células vizinhas a fazer o mesmo, amplificando o nível de A β nestas células também. Os oligômeros solúveis de A β parecem estar diretamente envolvidos com a inibição da potencialização de longo prazo do hipocampo pela interação com receptores de membrana de neurônios, podendo corromper a plasticidade sináptica (Walsh *et al.*, 2004). Entretanto, muitos pesquisadores tentam falsear esta hipótese, já que a deposição de placas não prediz a severidade da doença (Zhu *et al.*, 2007; Duyckaerts *et al.*, 2009). Ademais, foram encontrados depósitos de placas em idosos não-demenciados (Selkoe, 1991). Estudos farmacológicos visando a paralisação da doença não conseguiram conter sua progressão (Cummings *et al.*, 2006).

De acordo com a hipótese da hiperfosforilação da TAU, acredita-se que o primeiro evento da doença seja o aumento da atividade de suas proteínas quinases, levando assim ao aumento de sua fosforilação, privilegiando a formação dos emaranhados neurofibrilares intracelulares. Ensaio farmacológico *in vitro* produziram alterações e posterior morte neuronal após proporcionarem aumento da atividade de GSK3B. De maneira inversa, ensaios *in vitro* de inibição da mesma enzima preveniram degeneração neuronal, mesmo quando culturas eram

inoculadas com peptídeo A β e a hiperfosforilação da TAU estimulada (Forlenza *et al.*, 2000; Noble *et al.*, 2005). A hipótese da hiperfosforilação da TAU como evento primordial desencadeador da DA é corroborada pelos achados de Braak e Braak, nos quais a extensão das deposições de emaranhados neurofibrilares no tecido cerebral condiz com a progressão da severidade da doença (Braak e Braak, 1999). Entretanto, essa teoria também sofre críticas já que este tipo de inclusão está presente em outras patologias, comumente chamadas de tauopatias, sem haver associação à patogênese. Isso leva a crer que os depósitos parecem mais ser consequência de uma cascata de alterações prévias do que a origem do problema.

3.3 - A Genética na DA

Apesar da grande influência do ambiente, a doença de Alzheimer tem demonstrado apresentar um componente genético importante. De fato, existem duas formas de herança da doença, a DA de início precoce ou familiar (rara) e a DA de início tardio ou esporádica (mais freqüente).

A DA familiar é uma desordem autossômica dominante cujo início dos sintomas clínicos acontecem antes dos 65 anos. Até o fim da década de 70, imaginava-se que a DA poderia ser resultado de uma infecção viral de longo período de incubação e baixa resposta inflamatória, capaz de imitar o padrão de herança autossômico dominante (Harper, 1977). As primeiras evidências de que a DA deveria conter um componente genético só foram relatadas no início dos anos 80, como uma nova hipótese para tentar responder seu desenvolvimento em grande parcela de pacientes com síndrome de Down acima de 40 anos e em familiares de pacientes com manifestação de sintomas antes dos 65 anos (Harris, 1982). Esta associação entre trissomia do 21 e DA levou a comunidade científica a crer que um possível locus de susceptibilidade para a DA estava presente neste cromossomo triplicado, hipótese corroborada posteriormente à verificação da igualdade entre a seqüência de aminoácidos dos depósitos amilóide de cérebros de pacientes com DA portando ou não síndrome de Down. Somente em 1991 a primeira mutação associada à doença foi identificada no gene da Proteína Precursora de Amilóide, *APP*, no cromossomo 21 (21q21.3) (Goate *et al.*, 1991). Esta mutação de sentido trocado estava presente no exon 17, em uma região parcialmente codificante do peptídeo A β e substituía uma valina por uma isoleucina no aminoácido de posição 717 (Val717Ile), um

domínio transmembrana da proteína APP. Esta primeira mutação no gene *APP* associada à DA familiar levou o nome de mutação Londres (do inglês- *London mutation*). Atualmente existem 32 mutações no gene *APP* identificadas em 89 famílias estudadas no mundo, de acordo com o Banco de Dados de Mutações na doença de Alzheimer e demência Frontotemporal (<http://www.molgen.ua.ac.be/ADMutations>). Os outros dois genes, altamente similares, codificadores de duas proteínas componentes do complexo gama-secretase, a proteína Presenilina 1, *PSEN1*, (14q24.3) e a Presenilina 2, *PSEN2*, (1q31-q42), foram descobertos nos meados dos anos 90 e mostraram-se mais influentes na doença familiar. O gene *PSEN1* foi descoberto via estudos de ligação (*Lod scores*) e clonagem posicional de regiões do cromossomo 14 (Schellenberg *et al.*, 1992). Posteriormente, estudos de determinação de transcritos desta região e estudos de estrutura confirmaram a existência de um gene associado à DA de origem precoce (Sherrington *et al.*, 1995; Alzheimer's Disease Collaborative Group, 1995). Até o momento foram mapeadas 178 mutações no gene *PSEN1* em 393 famílias acometidas pela DA familiar, o que o torna o gene mais comum a apresentar mutações associadas a este tipo de DA. O último gene a ser associado à DA familiar, o gene *PSEN2*, foi descoberto quase que concomitantemente à descrição do gene *PSEN1*, em 1995, também por meio de estudos de ligação (Levy-Lahal *et al.*, 1995). Este gene apresenta poucas mutações associadas à DA familiar, sendo estas menos freqüentes. De acordo com o Banco de Dados de Mutações na doença de Alzheimer e demência Frontotemporal, atualmente existem 14 mutações descritas em 23 famílias ao redor do globo associadas à DA familiar. De maneira geral, os casos familiares de Alzheimer são raros, apresentando prevalência abaixo de 2% da população afetada.

Já a DA esporádica não apresenta nenhuma mutação gênica associada descrita até o momento; apesar disso sabe-se que apresenta contribuição genética indicada por estudos longitudinais de agregação familiar e estudos com gêmeos. Os primeiros estudos de agregação familiar já demonstraram que mesmo a DA esporádica apresentava um conteúdo genético influente. Em 1988, um estudo com 379 indivíduos revelou que parentes de primeiro-grau de pacientes apresentavam chance de 49% de desenvolvimento da doença aos 87 anos em contraste com o risco de 10% apresentado por pessoas sem parentesco (Breitner *et al.*,

1988). Estudos mais recentes com coortes maiores corroboram os primeiros achados e demonstraram que, para DA esporádica, o risco de herança da doença para parentes de primeiro grau de pacientes chega a ser duas vezes maior do que para indivíduos sem parentesco e a incidência na população geral (Launtenschlager *et al.*, 1996).

Estudos feitos com gêmeos foram primordiais para estabelecer o componente genético na DA esporádica. Para uma doença causada integralmente pela ação de genes, a concordância aproximada esperada para gêmeos monozigóticos é de 100%, e próximo a 50% para gêmeos fraternos ou irmãos fraternos. Estudos familiares escandinavos mostraram que gêmeos monozigóticos apresentam incidência maior para a DA do que gêmeos fraternos (Raiha *et al.*, 1996; Bergem *et al.*, 1997; Gatz *et al.*, 2006). Juntos, a estimativa de herdabilidade aponta para até 80% para a doença esporádica entre gêmeos (Gatz *et al.*, 2006).

Durante os estudos de ligação conduzidos a fim de se identificar o locus responsável pelo peptídeo beta-amilóide, Pericak-Vance e colaboradores, em 1991, realizaram um estudo com pacientes portadores de Alzheimer esporádico determinando a associação com um locus no cromossomo 19 (Pericak-Vance *et al.*, 1991). Ao mesmo tempo, estudos com anticorpos para proteínas associadas ao metabolismo de lipídios em tecido cerebral revelaram uma alta imunorreatividade para uma proteína denominada Apolipoproteína E (APOE) nas placas senis, vasos com angiopatia e emaranhados fibrilares (Namba *et al.*, 1991). Tal achado fez os pesquisadores se voltarem para esta proteína, visto que a mesma estava mapeada para o locus envolvido com a DA esporádica. Em 1993, dois grupos de pesquisa descobriram de forma independente, a associação de um dos alelos (E4) do gene *APOE* e a doença de Alzheimer, aumentando o risco de desenvolvimento da doença de maneira dose-dependente. (Strittmatter *et al.*, 1993; Corder *et al.*, 1993). Tal alelo opera de forma a diminuir a idade de aparecimento da doença, sendo cada cópia responsável pela diminuição da idade em até dez anos (Farrer *et al.*, 1997).

APOE é uma proteína de transporte de colesterol no cérebro para o reuso em lipídios de membrana e reparo neuronal (Poirier, 1994). O gene que a codifica apresenta três alelos mais frequentes, E2, E3 e E4, cujos produtos diferem entre si pela troca de dois aminoácidos, nas

posições 112 e 158. Imagina-se que o alelo E4, por apresentar uma substituição em duas argininas, codifique uma variante menos eficiente da proteína. Além disso, evidências da presença desta proteína nos depósitos extracelulares levam a crer que a APOE auxilie na deposição de A β , atuando como possível chaperona na formação de fibras e placas (Holtzman *et al.*, 2000). Calcula-se que o alelo E4 de APOE seja responsável por grande parte da suscetibilidade para o desenvolvimento da doença de Alzheimer esporádica (Raber *et al.*, 2004).

Polimorfismos e mutações de outros genes já foram associados à DA esporádica, mas não com a mesma intensidade e replicabilidade do alelo E4 de APOE. Todavia, é possível consultá-los no banco de dados Alzgene Database (<http://www.alzgene.org>) e visualizar aqueles cuja meta-análise de estudos de diferentes grupos, providenciada pelo próprio banco de dados, detectou maior associação. Em 23 de março de 2010, 2865 polimorfismos em 660 genes distribuídos em 1355 estudos estavam disponíveis para consulta nesse banco de dados. Dentre esses, incluem-se dois haplótipos do gene *SORL1*, um gene codificador da proteína Sortilina, um receptor envolvido no tráfego de proteínas até o endossomo, local no qual estima-se que ocorra a clivagem de APP. Estudos de diferentes grupos já associaram variantes da Sortilina com a doença de Alzheimer, mas sem muito consenso (Lee *et al.*, 2007; Meng *et al.*, 2007; Seshadri *et al.*, 2007; Tan *et al.*, 2007; Bettens *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2008).

Recentemente, com o avanço das técnicas de prospecção em massa, muitos grupos têm investido em estudos genômicos de associação em larga escala (GWAS, do inglês - *genome wide association studies*). Grande parte desses estudos divulgou seus resultados nos últimos 12 meses, com poucos dados replicados entre os grupos (Sleegers *et al.*, 2010). Porém, em setembro de 2009, dois grupos independentes com uma vasta coorte (14.000 – 16.000 pacientes e controles) e plataformas equivalentes de estudos de regiões gênicas, conseguiram obter significância de associação para uma região próxima ao gene codificador da proteína Clusterina (*CLU*), também denominada Apolipoproteína J, com um risco de chance (*odds ratio*) aumentado para DA de 1,18 vezes (Harold *et al.*, 2009; Lambert *et al.*, 2009). A Clusterina é uma chaperona secretada que aparentemente apresenta afinidade por um número extenso de

ligantes (Bartl *et al.*, 2001), entre eles o peptídeo A β . Na DA, a Clusterina pode ser encontrada nas placas amilóides extracelulares. Estima-se que esteja envolvida com a eliminação do peptídeo A β da célula, aumentando a endocitose e o transporte pela barreira hematoencefálica (Bartl *et al.*, 2001), estimulando indiretamente a formação dos oligômeros e placas de A β . Além disso, como a APOE, a CLU também está envolvida no transporte de colesterol para o seu reuso em membranas, e imagina-se que variantes genéticas nessa proteína poderiam contribuir para um aumento na susceptibilidade à DA, por aumentar o risco de doenças cerebrovasculares (Sleegers *et al.*, 2010). Apesar de apresentarem um estudo com grande número amostral, os dados para Clusterina ainda precisam ser validados em outros estudos diferentes para ser considerada, assim como o alelo E4 de APOE, um gene com forte associação à DA esporádica.

3.4 - Fatores de risco

Além da contribuição genética, descrita anteriormente, principalmente conferida à herança do alelo E4 de APOE, existem outros fatores que influenciam o risco de desenvolvimento da DA, e modificam a idade de acometimento e curso da doença esporádica. O principal fator de risco a ser considerado é a **idade**, visto que 90% dos casos são senis, como descrito, a prevalência dobra a cada 5 anos após os 65 anos de idade (Evans *et al.*, 1989; Stozická *et al.*, 2007).

Outros fatores de risco considerados em muitos trabalhos de epidemiologia são: **gênero**, já que a proporção de mulheres com DA em relação a homens é maior. Entretanto, muitos pesquisadores afirmam que tal diferença se perde quando os pacientes são pareados por idade, demonstrando que um número superior de casos de DA no sexo feminino seja decorrente de uma maior expectativa de vida neste grupo (Nitrini *et al.*, 2009); **condição sociodemográfica** (nível social, grau de escolaridade), indivíduos com menor escolaridade e nível cultural teriam redes cognitivas menos intrincadas e mais vulneráveis a neurodegeneração senil (Mortimer *et al.*, 2005; Stern, 2006); uma meta-análise de Nitrini e colaboradores demonstraram que apesar das taxas de prevalência de demência nos países Latino-Americanos ser semelhante à de países da América do Norte e Europa, a prevalência dessa

síndrome em idosos mais jovens (60-65 anos) mostrou-se superior, provavelmente em decorrência da baixa escolaridade e nível social (Nitrini *et al.*, 2009); **estilo de vida** (ex.: exercícios físicos), estudos recentes vêm associando a prática de exercícios físicos à maior plasticidade sináptica e conseqüentemente a uma menor incidência e atraso na idade de aparecimento de demência em idosos que o praticam (Kramer *et al.*, 1999; Laurin *et al.*, 2001; Larson *et al.*, 2006). Em contrapartida, indivíduos que não praticam atividade física apresentam risco elevado de desenvolver DA no futuro (Wang *et al.*, 2006); quanto ao **histórico clínico** (ex.: comorbidades, especialmente diabetes, hipertensão, e doenças vasculares), estudos mostram a associação positiva entre diabetes e DA (Luchsinger *et al.*, 2007a), hipertensão não tratada na meia-idade e DA (Kivipelto *et al.*, 2001; Qiu *et al.*, 2005; Freitag *et al.*, 2006), que podem ser decorrente de alterações vasculares (angiopatia, arteroesclerose), levando a extravasamento de sangue e menor fluxo sanguíneo além da desregulação da insulina, diminuindo a taxa de glicose e aumentando o estresse oxidativo e agregação de placas amilóide (Stozická *et al.*, 2007); **comprometimento cognitivo leve (CCL)**, refere-se a uma condição caracterizada por queixas de memória ou outra função cognitiva, sem afetar o desempenho do indivíduo em suas atividades diárias (Petersen *et al.*, 1999; 2001), mas que apresenta uma taxa de conversão para a DA de 10 a 15% ao ano (Petersen *et al.*, 2001; Ganguli *et al.*, 2004).

3.5 - Diagnóstico

O diagnóstico da DA é feito a partir da caracterização clínica do declínio cognitivo do paciente e da exclusão de outros fatores etiológicos. Os exames complementares de rotina, geralmente sem alterações, corroboram essa suspeita, não havendo até o momento um marcador patognomônico. Tendo em mãos todos os métodos disponíveis atualmente para o diagnóstico, o índice de acerto é de 90% em vida (Rezai-Zadeh, 2009). Dessa forma, o diagnóstico da DA é uma formulação probabilística: em vida, podem ser formulados os diagnósticos de DA provável ou DA possível, segundo os critérios NINCDS-ADRDA (*National Institute for Neurological and Communicative Disorders and Stroke – Alzheimer's Disease and Related Disorders Association*), propostos por McKhann e colaboradores em 1984. O diagnóstico definitivo só é

possível mediante a comprovação histopatológica *post-mortem* das lesões cerebrais que caracterizam a doença, isto é, as placas senis extracelulares em vasculatura e tecido cerebral, emaranhados neurofibrilares em regiões intracelulares, além da diminuição de sinapses e neurônios em regiões cerebrais específicas e a perda de conectividade neuronal como causa maior da demência (Jellinger, 2006; Jellinger, 2008a).

Assim, o diagnóstico da DA e a sua diferenciação de outras demências é considerado difícil e apenas possível em estágios avançados da doença, nos quais existe comprometimento severo da memória e outras funções cognitivas suficiente para terem um impacto no cotidiano do paciente (Jellinger *et al.*, 2008b).

4 - Biomarcadores

Parelelo aos esforços de estabelecer métodos para aprimorar o diagnóstico para a doença já em fase sintomática, encontram-se as buscas por marcadores que permitam o diagnóstico em estágios precoces da doença ou mesmo pré-clínicos. Tais marcadores pré-clínicos ou preditivos poderiam ser usados para a identificação de indivíduos normais com risco de desenvolver demência ou até mesmo para a identificação dos CCLs de alto risco de conversão. Além disso, é importante também a prospecção de marcadores indicativos de processos ou progressão patológica, tornando possível até a diferenciação entre os tipos de patologias que afetam os pacientes com demência e as mudanças patológicas em resposta ao tratamento (Lovestone *et al.*, 2009). São os chamados biomarcadores.

Os biomarcadores podem ser características morfológicas, de genes, transcritos, proteínas, peptídeos ou metabólitos presentes no sistema biológico (Hye *et al.*, 2006), e são definidos pela Divisão de Administração de Alimentos e Drogas norte-americana (FDA -*Food and Drug Administration Division*) como sendo: objetivamente mensuráveis, indicadores de processos biológicos normais; ou patológicos; ou de respostas à intervenções farmacológicas. Devem ser, sobretudo sensíveis e reprodutíveis. Além disso, um biomarcador ideal para a DA deve ser capaz de detectar uma característica fundamental da neuropatologia (validado em casos de DA confirmados); preciso (capaz de distinguir DA no início ou em seu curso e também diferenciá-

kas de outras demências), confiável, não-invasivo, de simples performance e baixo custo (*Consensus Report of the Working Group on Molecular and Biochemical Markers of Alzheimer Disease*, 1998).

4.1 - Prospecção de biomarcadores na DA

De acordo com a definição criada pelo Grupo de Trabalho em Marcadores Moleculares e Bioquímicos para a Doença de Alzheimer, citado anteriormente, percebe-se a busca de biomarcadores restringe-se muito. Além disso, o tecido acometido não é acessível em vida, tornando-se necessário recorrer a outros métodos. A maioria dos estudos de prospecção de biomarcadores para a DA recorre a mecanismos de neuroimagem estrutural e funcional (MRI, PET Scan), ou prospecção de biomarcadores em potencial em tecido periférico, como líquidocefalorraquidiano (LCR) e sangue.

A neuroimagem estrutural provê boa resolução espacial e, no caso da MRI, a possibilidade de distinguir regiões cerebrais e diferentes estruturas, podendo até diferenciar tecidos ou camadas corticais. As técnicas de imagem funcional, por outro lado, adquirem informações sobre parâmetros do metabolismo cerebral, como fluxo sanguíneo regional ou metabolismo de glicose. Também podem ser usados para coletar informações estruturais, mas possuem uma resolução mais baixa que MRI (Cedazo-Minguez e Winblad, 2010).

Estudos utilizando a técnica de MRI têm demonstrado que perdas regionais de volume cerebral (hipocampo e regiões corticais) correlacionam com outros processos patológicos da DA já conhecidos e podem ser usados como marcadores de diagnóstico ou mesmo de conversão (Nestor *et al.*, 2008; Desikan *et al.*, 2009; Querbes *et al.*, 2009; Davatzikos *et al.*, 2009). Resultados interessantes também têm sido obtidos por PET scan e uma sonda de baixo peso molecular específica para peptídeo A β marcada radioativamente, o composto B de Pittsburgh (^{11}C -PiB - *Pittsburgh compound B*). Observou-se que a absorção de ^{11}C -PiB correlaciona-se diretamente com a piora de memória episódica em CCLs e controles, mas não em indivíduos com DA (Pike *et al.*, 2007), e também, percebeu-se que a região do lobo medial temporal, uma

das que mais apresentava absorção de PiB, estava com maior atrofia (Jack *et al.*, 2008; Frisoni *et al.*, 2009).

Não se pode negar que a neuroimagem possibilitou muitos avanços no diagnóstico da DA, e tem ajudado a elucidar a progressão da patologia. Todavia, para a rotina clínica, ainda existem controvérsias sobre a aplicabilidade dos métodos de neuroimagem. Dados de interpretação difícil e o alto custo das técnicas e aparelhos podem limitar seu uso apenas em grandes centros (Song *et al.*, 2009).

Assim sendo, estudos envolvendo a prospecção de biomarcadores em tecido periférico têm ganhado destaque na última década. Para a DA, LCR é considerado o fluido ideal para a busca de biomarcadores em potencial devido a sua troca direta de moléculas com o tecido cerebral, podendo refletir os processos metabólicos desse órgão (Reiber e Peter, 2001). De fato, as pesquisas nesta área estão em um estágio avançado e alguns marcadores em potencial têm sido cogitados para auxiliar no diagnóstico clínico. Há mais de uma década grupos do mundo inteiro têm realizado estudos com LCR envolvendo as proteínas mais bem correlacionadas com a DA; APP, TAU e diversas formas do peptídeo A β . A maior parte desses estudos observou uma diminuição de A β 42, bem como aumento de proteína TAU total (tTAU) e fosforilada (pTAU) em pacientes com DA em relação à grupos controle com especificidade e sensibilidade entre 80 e 90% (revisto em Craig-Shapiro *et al.*, 2009). Não obstante, tais marcadores também foram específicos o suficiente para identificar os pacientes com CCL com mais chance de conversão para DA (Hampel *et al.*, 2008). Esses dados vêm estimulando muitos pesquisadores a afirmar que estes três componentes podem ser utilizados como biomarcadores para auxiliar no diagnóstico da DA. Entretanto, a punção lombar é um obstáculo por ser considerada relativamente invasiva e por necessitar de um profissional altamente treinado, o que não é realidade em muitos locais, impossibilitando sua aplicação rotineira. Finalmente, o procedimento requer muito cuidado para que não haja contaminação com sangue e conseqüentemente influência nos resultados, o que é um risco feito repetidas vezes nos pacientes.

Dessa forma, a prospecção de biomarcadores para a DA em sangue, apesar deste não ser a matriz com contato mais direto com tecido cerebral, é visto como a melhor e mais realista para a prática clínica. A venipuntura é uma técnica de custos baixos, de fácil execução, permite performances repetidas se necessário, trazendo menos desconforto para o paciente, não necessita de um profissional altamente qualificado para a sua execução e além de tudo é mais barata de ser executada. Apesar de ser uma matriz complexa e estar em contato com todo o sistema fisiológico, muitos estudos evidenciaram que o sangue é capaz de refletir na periferia alguma alteração pontual (Song *et al.*, 2009). Além disso, estima-se que pelo menos 500 mL de LCR seja absorvido por dia pelo sangue; no caso da DA, imagina-se que, devido a lesões na vasculatura cerebral, evidenciada muitas vezes pela deposição de placas amilóide, “impressões digitais” da doença possam passar para o tecido periférico através da barreira hematoencefálica comprometida (Zipser *et al.*, 2007; Schneider *et al.*, 2009). O plasma, plaquetas e leucócitos são as matrizes de prospecção mais utilizadas no tecido periférico para a busca dos biomarcadores.

A utilização de plasma sanguíneo como matriz de prospecção de biomarcadores para doenças neurodegenerativas iniciou-se com a Doença de Alzheimer a mais de uma década, em estudos clássicos de quantificação de moléculas envolvidas com a patologia, como A β . Essas publicações envolvendo casos de DA familiar e pacientes com Síndrome de Down demonstraram que os pacientes com DA apresentavam níveis de A β mais elevados do que controles (Kosaka *et al.*, 1997; Schupf *et al.*, 2001). Posteriormente o mesmo foi feito para casos de DA esporádico, muito embora até agora não existam achados consistentes para diagnóstico (Cedazo-Minguez e Winblad, 2010). Por outro lado, muitos grupos têm encontrado resultados similares que podem prever conversão. Estudos longitudinais indicam que aumento dos níveis de A β 42, ou a diminuição de A β 40 ou a diminuição dos níveis da razão A β 42/A β 40 em controles possam ser interpretados como conversão para CCL ou estado clínico da DA (van Oijen *et al.*, 2006; Graff-Radford *et al.*, 2007; Sundelof *et al.*, 2008). Entretanto, alguns pesquisadores pedem cautela na interpretação dos dados, visto que os níveis de A β em LCR e plasma não se relacionam em um mesmo indivíduo (Vanderstichele *et al.*, 2000) por existir grande variabilidade nos níveis de A β medidos intra e inter indivíduos (Abdullah *et al.*,

2007). Assim, muito embora possam prever conversão, tais marcadores não se relacionam com o processo neuropatológico da DA, pois não mostraram correlação com o grau de deposição de placas e os níveis de A β 40 e A β 42 em córtex temporal e frontal em tecido *post-mortem* dos mesmos indivíduos cujo plasma e LCR foram coletados e analisados em vida (Freeman *et al.*, 2007). Ademais, níveis de A β 42 mostraram-se influenciados pela utilização de medicamentos concomitante à quantificação de níveis plasmáticos. Medicamentos associados ao tratamento de diabetes estimularam aumento de concentração plasmática de A β enquanto que *gingko-biloba* estimulou redução da concentração desse peptídeo (Blasko *et al.*, 2005).

Os leucócitos são células cuja importância para DA dedicava-se inicialmente para a análise de polimorfismos, mas que na última década têm sido amplamente utilizadas para a verificação de alterações de expressão gênica e protéica em pacientes com DA (Kálmán *et al.*, 2005; Maes *et al.*, 2006; Mhire *et al.*, 2008; Cosentino *et al.*, 2009; Ciaramella *et al.*, 2010). O cérebro mantém uma relação intrínca com o sistema imune (Franceschi *et al.*, 2007; Giunta *et al.*, 2008). Na DA, observou-se que tanto as placas quanto os emaranhados são acompanhados de uma proeminente resposta imune e inflamatória local (revisto em Akiyama *et al.*, 2000; McGeer *et al.*, 2003). Mohr e colaboradores, em 2007, encontraram 80% de semelhança entre a expressão gênica de leucócitos e tecido cerebral. Dentre os estudos realizados com pacientes com DA é importante citar o estudo de Alvarez e colaboradores (1996), que encontraram em leucócitos de DA, alta expressão da proteína IL-1, uma citocina que encontra-se associada a região de inflamação que cerca as placas senis. Além desse, estudos recentes compararam a expressão gênica de leucócitos de sangue periférico de pacientes com DA em relação a controles, identificando diferenças na expressão de genes associados as sinapses, inflamação, transporte celular e apoptose em pacientes com DA (Kálmán *et al.*, 2005; Maes *et al.*, 2006).

As plaquetas, células anucleadas envolvidas com a coagulação e cicatrização, também são amplamente utilizadas na prospecção de biomarcadores. Evidências de que as plaquetas produzem serotonina em seu interior fizeram com que os pesquisadores voltassem a atenção para essas células e tentassem compreender sua relação com o tecido neuronal (Humphrey e Jaques, 1954). Estudos posteriores relataram a presença de neurotransmissores e receptores

neurais nestas células e elas passaram a ser consideradas o “espelho fisiológico” do neurônio para aqueles interessados em obter informações do estado do tecido neuronal na região periférica. Neste sentido, a descoberta, em plaquetas, da expressão de APP e da presença de toda a sua maquinaria de clivagem, inclusive com a produção de peptídeo Abeta (revisto em Li *et al.*, 1998), também evidenciou a importância destas células na prospecção de biomarcadores para DA. Inicialmente, Zubenko, em 1987, descreveu alterações na fluidez de membrana de plaquetas em pacientes com DA em relação à controles. Depois dele, inúmeros trabalhos reportaram, em plaquetas de pacientes com DA, deficiências em proteínas associadas ao citoesqueleto, citocromos oxidases, influxo de cálcio, aumento de proteína quinase C e aumento da atividade de subtipos de fosfolipases (revisado em Cattabenni *et al.*, 2004). Estudos de nosso grupo correlacionaram a diminuição de proteínas da família da fosfolipase A2 em plaquetas com o aumento da severidade da DA (Gattaz *et al.*, 1996), e os achados recentes da diminuição de APP solúvel em pacientes com DA em relação aos controles (Zainaghi *et al.*, 2007).

5 - Biomarcadores de expressão

Na busca por biomarcadores na DA, atualmente é crescente a utilização de técnicas mais modernas e precisas, como PCR em tempo-real e ferramentas de prospecção de perfis de expressão em larga escala, como SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*), *microarray* e Eletroforese Bidimensional para proteínas seguida de identificação de peptídeos via espectrometria de massas.

Dentre as ferramentas de prospecção de genes, a técnica de *microarray* é a mais utilizada atualmente devido ao decaimento do custo dos *chips* no mercado internacional e pelo aumento de sua disponibilidade comercial. Tal técnica consiste no mapeamento do perfil de expressão gênica de uma dada condição experimental ou de um tecido. Essa técnica permite uma visão mais compreensiva das inter-relações entre processos e o contexto no qual alguma molécula ou via está operando (Blalock *et al.*, 2005). Isso se dá pela hibridação entre os cDNAs de interesse (material obtido pela transformação de RNA mensageiros, de fita simples, em um DNA complementar, de fita dupla, mais estável bioquimicamente) marcados com fluorescência

e as sondas de oligonucleotídeos cuja seqüência é complementar a produtos de transcrição gênica específicos, distribuídas em *spots* em uma lâmina de nylon, vidro ou sílica. Tais lâminas atualmente apresentam em seus *spots* sondas mapeadas para o genoma humano completo, bem como de outros organismos cujo genoma também foi inteiramente ou parcialmente seqüenciado, como *Mus musculus*, *Danio rerio* e *Rattus norvegicus* entre outros organismos-modelo. Os ensaios podem ser feitos com uma fluorescência apenas, em estudos que visam mapear perfis de expressão de um dado tecido, ou com duas fluorescências, em estudos comparativos, em duas condições biológicas. O objetivo não é somente detectar, pela hibridação, transcritos expressos em uma dada condição, mas também se pode quantificar a expressão por meio da intensidade da fluorescência do material hibridado, sendo esta lida por um feixe de laser e decodificada por um *scanner* confocal. A decodificação gera uma imagem digitalizada do *microarray* que é processada por um *software* e transformada em um valor numérico proporcional a intensidade da fluorescência lida. Em ensaios envolvendo duas fluorescências, a leitura é transformada em uma razão igual à abundância relativa da seqüência alvo de uma amostra com relação à mesma seqüência de uma amostra referência (um controle) (revisto em Trevino *et al.*, 2007).

Outra estratégia para prospecção de marcadores biológicos que também tem ganhado bastante notoriedade atualmente é a análise de perfis protéicos por Eletroforese Bidimensional (2DE). A análise protéica baseada em 2DE, com posterior análise em um espectrômetro de massas é o método mais desenvolvido e versátil existente, permitindo uma abordagem de boa parte das características das proteínas como ponto isoelétrico (pI), massa molecular, hidrofobicidade e modificações pós traducionais (Rabilloud, 2002).

A maior vantagem da 2DE consiste na possibilidade de separar uma grande quantidade de proteínas – ao redor de 2000 – presentes em uma dada amostra utilizando apenas um mesmo gel (Zhu *et al.*, 2003; López, 2007). A técnica de separação de proteínas baseada na 2DE consiste na focalização isoelétrica (IEF) das proteínas, na qual são separadas em um gradiente de pH até o ponto estacionário, ou pI, no qual adquirem carga total zero (1ª Dimensão). Após esta etapa, as proteínas são separadas de acordo com sua massa molecular (MW) por meio de

eletroforese em gel de poliacrilamida contendo sulfato dodecil de sódio (SDS-PAGE) (2ª Dimensão) (O'Farrel, 1975; Zhu, *et al.*, 2003). O resultado da 2DE é um perfil no qual cada proteína está alocada em um ponto ou “spot” no gel. Cada spot contém múltiplas cópias da proteína correspondente, sendo que a intensidade e a área de cada spot podem fornecer dados quantitativos sobre a expressão da mesma. Assim, a alta resolução da eletroforese 2DE provém do fato de que a separação das proteínas depende de parâmetros diferentes na primeira e segunda dimensão, pI e massa molecular, respectivamente (Ong e Pandey, 2001). Desta forma, é possível determinar o perfil global de proteínas em uma amostra distinguindo-as em proteínas ácidas, básicas, de alto ou baixo peso molecular. Os spots de interesse são removidos individualmente, as proteínas nele contidas são submetidas à digestão triptica *in gel* e, a seguir levadas ao espectrômetro de massas. Pela relação massa/carga dos peptídeos, obtidos pela digestão da proteína, é feita a identificação de uma característica única dessa proteína, denominada *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF), na qual a identificação é feita de acordo com um padrão de fragmentação previsível, resultando em um conjunto de peptídeos com massas únicas, que podem ser considerados como uma espécie de “impressão digital” (Pappin *et al.*, 1993; Corthals *et al.*, 1999; Aebersold e Goodlett, 2001; Thiede *et al.*, 2005). Assim, embora algumas diferentes proteínas possuam um alto grau de similaridade na estrutura primária, muitas regiões de sua sequência peptídica são únicas. Finalmente, por meio de uma clivagem *in silico* a partir de bancos de dados de sequências peptídicas é possível comparar os dados obtidos experimentalmente e identificar a proteína em questão (Henzel *et al.*, 2003).

II – Objetivos

1 - Objetivo geral

Esse estudo foi desenvolvido com o objetivo principal de identificar possíveis marcadores periféricos de diagnóstico e/ou progressão utilizando estudos de expressão gênica e proteômica, dada a dificuldade na caracterização clínica da DA e a ausência de marcadores periféricos patognomônicos da doença.

2 - Objetivos específicos

(1) Selecionar genes candidatos pela análise comparativa de dados processados de estudos que utilizaram a ferramenta de *microarrays* para a verificação da expressão diferencial em tecido cerebral e sangue periférico de pacientes portadores de Doença de Alzheimer na busca de candidatos a biomarcadores na doença.

(2) Validação de genes selecionados como diferencialmente expressos no item 1 por PCR em tempo-real em amostras de RNA extraídos a partir de sangue periférico de pelo menos 20 pacientes com DA e 20 controles idosos.

(3) Padronizar a técnica de Eletroforese Bidimensional para proteoma de plaquetas.

(4) Comparar o proteoma de plaquetas de pacientes com DA e controles idosos, por meio de Eletroforese Bidimensional a fim de buscar possíveis biomarcadores protéicos periféricos.

(5) Os *spots* eventualmente identificados como diferencialmente expressos no item 4 serão identificados em espectrometria de massa.

III – Material e Métodos

1 - Obtenção de dados da literatura

Fez-se busca de artigos que utilizaram a técnica de *Microarray* em tecido cerebral e/ou sangue periférico de pacientes com DA publicados em periódicos indexados no *PubMed* do *National Center of Biotechnology Information* (NCBI -<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) e *Isi Knowledge* [v.4.3] - *Web of Science* (<http://www.isiknowledge.com>) nos anos de 2001 a 2007. A estratégia de procura empregada utilizou os seguintes termos-chave ("*Alzheimer's Disease*") combinada a ("*brain*") ou ("*blood*") também combinados com ("*gene expression*") ou ("*microarray*") ou ("*differential expression*"). Todos os termos procurados poderiam ser encontrados em qualquer parte do artigo, desde o título até corpo do texto.

Em seguida fez-se a análise segundo os seguintes critérios: **(a)** foram selecionados estudos que avaliaram a expressão de genes em larga escala com a técnica de *microarray* em tecido cerebral e/ou sangue periférico de pacientes com DA; **(b)** os artigos deveriam ter data de publicação dentro do período de 2001-2007; **(c)** os dados deveriam estar processados e publicados nestes artigos; **(d)** os dados publicados deveriam ser estatisticamente significantes (nesse último, os critérios adotados variam entre os grupos).

Os genes publicados foram processados em planilhas do Microsoft Excel® (*Microsoft Corporation, CA, USA*), uma para cada autor, organizados por condição de expressão (hiper-expressos e hipo-expressos) no paciente em relação ao controle. Os genes que apareceram em mais de uma planilha sob mesma condição (genes validados por 2 ou mais estudos) foram selecionados como genes candidatos a serem validados por meio da técnica de PCR em tempo-real. Essa validação foi realizada em RNA extraído a partir de leucócitos de sangue periférico de pacientes portadores de Doença de Alzheimer e controles saudáveis em nosso laboratório.

2 - Casuística

Os pacientes com DA e seus respectivos controles foram provenientes do Ambulatório de Psicogeriatria do Laboratório de Neurociências (LIM-27), do Departamento e Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo/SP, coordenado pelo Dr. Orestes V. Forlenza. Pacientes e controles foram examinados por uma equipe multidisciplinar a qual inclui psiquiatras, neurologistas, geriatras e neuropsicólogos. O diagnóstico de todos os pacientes, como DA possível ou provável, e controles é efetuado de acordo com o critério NINCDS-ADRDA (McKhann *et al.*, 1984) após uma abrangente avaliação clínica e cognitiva, como descrito por Diniz e colaboradores (2008) e Forlenza e colaboradores (2009). A avaliação clínica e cognitiva é feita por via da administração da versão brasileira do teste CAMDEX (Roth *et al.*, 1986; Bottino *et al.*, 1999), o qual inclui o *Cambridge Cognitive test* (CAMCOG), *Mini Mental State Examination* (MMSE) (Folstein *et al.*, 1975), teste do desenho do relógio (Sunderland *et al.*, 1989), fluência verbal (categoria de frutas e animais) (Erzigkeit, 1991) *Rivermead Behavioral Memory Test* (Wilson *et al.*, 1985), *Fuld Object Memory Evaluation* (FOME) (Fuld, 1980), Trilha A e B e *Short Cognitive Test* (Erzigkeit, 1991; Flaks *et al.*, 2006; War Department Adjutant General's Office, 1944). Evidência de declínio funcional foi baseada na pontuação do *Informant Questionnaire on Cognitive Decline in the Elderly* (IQCODE) (Jorm *et al.*, 1989) e em todas as evidências disponíveis de dificuldades para desempenhar atividades instrumentais e práticas no cotidiano do idoso, descritas por um parente ou cuidador ou mesmo pelo próprio paciente. Além desses, o teste *The 21-item Hamilton Depression Scale* (HAM-D) (Hamilton, 1960) também foi administrado para verificação de sintomatologia de depressão. Pontuação abaixo de sete foi considerada como evidência de ausência de episódios de depressão. Também foram efetuados testes laboratoriais em todos os sujeitos de estudo para excluir causas potencialmente reversíveis para o declínio cognitivo, incluindo: função tireoidiana, hemograma completo, análise bioquímica do sangue, ácido fólico e vitamina B12, perfil lipídico sanguíneo e teste de sífilis (Diniz *et al.*, 2008). Indivíduos caracterizados como controles, mas com histórico de doença de Alzheimer diagnosticada na família foram excluídos do estudo.

Os pacientes ou seus responsáveis e os indivíduos-controle são informados sobre o protocolo de estudo, previamente aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP (processo 1053/02; aprovado em 19/dez/2002) e somente participam aqueles que concordam e assinam o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Informações como escolaridade e genotipagem para APOE foram selecionadas para os indivíduos participantes do estudo em nosso banco de dados, quando disponível. Estas informações encontram-se discriminadas na seção X-Apêndice (Tabelas 12 e 13). A escolaridade média para os pacientes com DA foi de 6,68 anos (Desvio padrão: $\pm 5,7$), enquanto que para os controles foi de 14,5 anos (Desvio Padrão: $\pm 5,1$). A distribuição dos genótipos nos pacientes foi a seguinte: 6,6% de E2/E3; 47% de E3/E3; 40% de E3/E4 e 6,6% E4/E4. Já para os controles foi: 4,7% de E2/E2; 14% de E2/E3; E3/E3 de 71%; 9,5% de E3/E4.

Foram coletados aproximadamente 10-12 mL de sangue periférico via punção venosa do antebraço para extração de RNA a partir de leucócitos e proteínas a partir de plaquetas. O sangue foi coletado em tubos estéreis contendo 7,2 mg de anticoagulante de EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (*BD Vacutainer® blood collection tubes*, BD, NJ, USA) e processado imediatamente para a obtenção de RNA total ou separação de plaquetas.

2.1 - Caracterização das amostras utilizadas para o estudo de expressão gênica em leucócitos

Para a análise de expressão gênica diferencial foram utilizadas amostras de 20 pacientes com DA (16 mulheres, 4 homens, média de idade = $80,58 \pm 6,29$, min = 69, max = 91) e 20 controles (16 mulheres, 4 homens, média de idade = $72,6 \pm 4,68$ – min = 65, max = 82) (Tabela 1). Coletamos adicionalmente para os testes de padronização das extrações de RNA e expressão gênica, amostras de sangue periférico de voluntários jovens.

Tabela 1. Descrição do número de pacientes e controles selecionados para o estudo de expressão gênica e a média de idade de cada grupo seguido do desvio padrão.

	Pacientes com DA	Controles
Número de Indivíduos	20	20
Mulheres	16	16
Homens	4	4
Média de idades	80,58	72,6
Desvio-padrão	± 6,29	± 4,68
Mínimo	69	65
Máximo	91	82

Sabendo que a medicação pode ser um fator de influência no perfil de expressão gênica e protéica dos indivíduos, foram analisados e listados os medicamentos utilizados pelos componentes dos grupos estudados à época da coleta de sangue (Tabela 2). Dos indivíduos selecionados para a pesquisa, 17 pacientes faziam uso de inibidor de acetilcolinesterase, sendo 8 usuários de rivastigmina (variação por paciente de 5 -12 mg/dia), 8 de (S) donepezil (variação por paciente de 5 – 10 mg/dia) e um de galantamina (24 mg/dia). Além desse medicamento os indivíduos deste estudo faziam uso de outras medicações descritas a seguir: 7 pacientes faziam uso de antipsicóticos diversos, sendo 3 usuários de risperidona (variação por paciente de 1 - 1,5 mg/dia), 1 de quetiapina (25 mg/dia) e 3 de olanzapina (2,5 - 5 mg/dia); também foi observado que 10 pacientes e 7 controles faziam uso de antidepressivos sendo que 8 pacientes e 7 controles eram usuários de inibidores seletivos da recaptação de serotonina como a sertralina e fluoxetina (variação por paciente 20 – 100 mg/dia) e 1 paciente era usuário tanto de um antidepressivo tricíclico (amitriptilina 25 mg/dia) quanto de um tetracíclico (mirtazapina – 15mg/dia); alguns indivíduos faziam uso de Inibidor de enzima conversora de angiotensina, sendo 4 pacientes (variação 5 – 25 mg/dia) e 2 controles (40 mg/dia); observou-se também o uso de estatinas por 4 pacientes e 4 controles (5 – 10 mg/dia); 1 paciente e 3 controles faziam uso de medicação para hipotireoidismo, como a levotiroxina (variação de 25 –

50 mg/dia); 2 pacientes e 3 controles faziam uso de medicamentos diuréticos, sendo que 1 paciente e 2 controles eram usuários de hidroclorotiazida (25 mg/dia), 1 paciente era usuário de indapamina (5 mg/dia) e 1 controle era usuário de furosemida (40 mg/dia); 1 paciente e 2 controles faziam uso de medicação para insônia, como zolpidem (10 mg/dia). Além desses medicamentos listados, alguns indivíduos também faziam uso de outras medicações de registro único, classificadas como “Outros”, e são: bromazepam (1,5 mg/dia), ácido valpróico (500 mg/dia), atenolol (50 mg/dia), gabapentina (60 mg/dia), espironolactona (25 mg/dia), digoxina (0,25 mg/dia), carvedilol (50 mg/dia), amiodarona (400 mg/dia) e varfarina (5 mg/dia). Foi observado que 3 pacientes e 7 controles não faziam uso de qualquer tipo de medicação próximo a data da coleta de sangue. Informações individuais sobre os participantes do estudo se encontram discriminadas na seção Apêndice (Tabela 13).

Tabela 2. Descrição da medicação utilizada pelos pacientes (DAs) e controles no período de coleta de sangue para o estudo de expressão gênica

	DAs	Controles
Inibidores de Acetilcolinesterase	17	0
Antipsicóticos	7	0
Antidepressivos	10	6
Inibidor de enzima conversora de angiotensina	4	2
Estatinas	4	4
Repositor hormonal da tireóide	1	3
Diuréticos	2	2
Tratamento de insônia	1	2
Outros	3	4
Sem qualquer uso de medicação	3	7

2.2 - Caracterização das amostras utilizadas para o estudo de perfil protéico de plaquetas

Foram selecionadas para os testes de padronização de extração de proteínas, amostras de plaquetas de 12 pacientes e 9 controles de sexo masculino, pareados por idade. Após a padronização, foram selecionadas 5 amostras de proteínas de plaquetas desses pacientes (média de idade = $73,5 \pm 4,04$ min = 70, max = 79) e 5 amostras de proteínas de plaquetas dos controles (média de idade = $73,6 \pm 6,54$ min = 64, max = 82) para a composição do *pool* de proteínas utilizado na realização do perfil protéico de plaquetas por Eletroforese Bidimensional (Tabela 3).

Também foi executada a extração de proteínas de plaquetas de 6 pacientes e 6 controles femininos pareados por idade, e, de todas as amostras extraídas de cada grupo de cada gênero, 5 foram selecionadas para a realização do *pool* de amostras de proteínas (média de idade pacientes = $77,6 \pm 7,06$ min = 67, max = 84; média de idade controles = $70,6 \pm 3,97$ min = 66, max = 76) para a realização dos perfis protéicos (Tabela 3).

Tabela 3. Descrição do número de indivíduos selecionados para a obtenção do pool de proteínas de plaquetas para realização do perfil protéico e a média de idades e desvio padrão obtidos.

	<i>Pool DAs</i>	<i>Pool Ctrls</i>
Número de Indivíduos (perfil masculino)	5	5
Média de idades (perfil masculino)	73,5	73,6
Desvio-padrão	± 4,04	± 6,54
Mínimo	70	64
Máximo	79	82
Número de Indivíduos (perfil feminino)	5	5
Média de idades (perfil feminino)	77,6	70,6
Desvio-padrão	± 7,06	± 3,97
Mínimo	67	66
Máximo	84	76

Assim como para o estudo de expressão gênica, também foi efetuada a avaliação dos medicamentos utilizados pelos pacientes e controles dos grupos estudados à época da coleta de sangue desses indivíduos para a posterior verificação da potencial influência desses fármacos no padrão de expressão protéica obtida (Tabela 4). Todos os pacientes, de ambos os sexos, tomavam inibidores de acetilcolinesterase, sendo que 6 utilizaram rivastigmina (variação de 3 -6 mg/dia) e 4 utilizaram (S) donepezil (variação de 5 -10 mg/dia). Além dessa medicação, 2 pacientes, 1 do sexo masculino e 1 do sexo feminino faziam uso de antipsicóticos, como risperidona (1 mg/ dia) e quetiapina (50 mg). Foi observado o uso de antidepressivos por 3 pacientes (1 homem e 2 mulheres) e 6 controles (3 homens e 3 mulheres) sendo eles inibidores seletivos da recaptção de serotonina como a sertralina, fluoxetina e paroxetina (variação de 20 mg – 50 mg/ dia). Apenas um paciente do sexo masculino fez uso de inibidor de enzima conversora de angiotensina (5 mg/dia). Além disso, 3 pacientes do sexo masculino

fizeram uso de estatinas (variação de 5-10 mg/dia). No grupo feminino 2 indivíduos controle fizeram uso de medicação para hipotireoidismo, como a levotiroxina (variação de 25 -50 mg/dia). Além desses medicamentos, alguns indivíduos também fizeram uso de outras medicações, categorizadas como outros e são: pramipexol (1 mg/dia), levodopa (200 mg/dia) por um paciente do sexo masculino, metformina (850 mg/dia) por um controle masculino e um feminino, e ácido valpróico (250 mg/dia) por uma paciente. Informações individuais sobre os participantes do estudo se encontram discriminadas na seção Apêndice (Tabela 12).

Tabela 4. Descrição da medicação utilizada pelos pacientes (DAs) e controles do sexo masculino e feminino no período de coleta de sangue cujas proteínas de plaquetas formaram o *pool* utilizado para o estudo de perfil protéico por Eletroforese Bidimensional.

	DAs	Controles	DAs	Controles
	masculinos	masculinos	femininos	femininos
Inibidores de Acetilcolinesterase	5	0	5	0
Antipsicóticos Atípicos	1	0	1	0
Antidepressivos	1	3	2	3
Inibidor de enzima conversora de angiotensina	1	0	0	0
Estatinas	3	0	0	0
Repositor hormonal da tireóide	0	0	0	2
Diuréticos	0	0	0	0
Outros	1	1	1	1
Sem qualquer uso de medicação	0	2	0	1

3 – Estudos de expressão gênica de leucócitos

3.1 - Padronização da extração de RNA a partir de leucócitos de sangue periférico

Todos os testes de padronização foram baseados no protocolo de extração de RNA de leucócitos de sangue periférico, desenvolvido em nosso laboratório, utilizando o reagente TRIzol® (Invitrogen, CA, USA), com modificações na estratégia de isolamento das células leucocitárias, para a melhor obtenção de moléculas de RNA íntegras, com massa suficiente para a condução dos experimentos, e sem contaminação com DNA genômico aparente. Foram realizados dois protocolos principais de isolamento de RNA a partir de sangue periférico, descritos a seguir.

No primeiro protocolo utilizado para o isolamento de leucócitos, faz-se a lise de hemácias com a incubação, por 30 minutos, do sangue total em um tampão isotônico consistindo em 155mM de NH_4Cl e 15mM de NH_4HCO_3 , e a decorrente eliminação das células vermelhas após uma breve centrifugação (960xG; 10 min; 4 °C). Testou-se, neste passo, uma ou mais lavagens com o tampão isotônico antes da completa eliminação das células vermelhas. O *pellet* de leucócitos que se forma após essa centrifugação foi submetido ao protocolo de extração pelo método TRIzol® (Invitrogen, CA, USA) de acordo com o fabricante. Ao final da extração, as amostras de RNA foram diluídas em 20µL de água deionizada ultrapura livre de RNase.

Já o segundo protocolo orienta a separação das células leucocitárias utilizando Ficoll-Paque™ (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden), seguindo o protocolo do fabricante. Neste protocolo, o sangue coletado foi submetido a uma primeira centrifugação para a separação do plasma dos eritrócitos e linfócitos. Essas células foram incluídas em um mesmo volume de Solução Tampão Fosfato-Salina (PBS 50 mM, pH 7,4) e esta solução foi homogeneizada e transferida, com cuidado, para um tubo de centrífuga de 15 mL estéril (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) já contendo 5 mL de Ficoll-Paque™ (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). O composto bifásico que se forma foi submetido a uma centrifugação baixa (400 G; 30 min; 20 °C). Após a centrifugação houve a formação de um “anel” de leucócitos na região interfásica da solução rica em plaquetas sobrenadante, e o Ficoll, mais denso, na fase abaixo. Este “anel” foi

retirado cuidadosamente com o auxílio de uma pipeta, de forma a não contaminá-lo com a solução de plaquetas ou com o Ficoll e foi transferido para outro tubo de centrifuga de 15 mL contendo uma solução de lavagem para a retirada de resquícios de plaquetas (10 mM de Tris, 1 mM, EDTA, pH 7,4). A solução de lavagem com os linfócitos foi homogeneizada e centrifugada (100 G; 10 min, 20 °C). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de leucócitos subsequentemente obtido foi submetido ao protocolo de extração pelo método TRIzol® (Invitrogen, CA, USA) de acordo com o fabricante. Ao final da extração, as amostras de RNA foram diluídas em 20 µL de água deionizada ultrapura livre de RNase.

3.2 - Integridade e quantificação do RNA

A pureza do RNA foi determinada pela relação A_{260nm}/A_{280nm} e a integridade das amostras foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% utilizando tampão TBE 1X [Tris-HCl a 45 mM, ácido bórico a 45 mM e EDTA a 1 mM (pH 8,0)] e Isotiocianato de Guanidina (2 mM) (Sambrook, 2001) e corado com brometo de etídio (0,4 mg/mL). A separação eletroforética foi realizada a 90 V e 60 mA por 30 minutos, em cuba de eletroforese horizontal e o RNA foi visualizado sob luz UV e fotodocumentados em sistema de captura de imagem MultiImage Light Cabinet, Chemilmager v 5.5, (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, USA). A quantificação das amostras foi feita por espectrofotometria, utilizando-se o aparelho NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware, USA), com coeficiente de extinção 40ng-cm/µL e comprimento da trajetória da luz OD₂₆₀ 0,1cm, seguindo a equação de Beer-Lambert: **Concentração de RNA [ng/µL] = (OD₂₆₀ x 40 ng-cm/µL)/0.1cm**

3.3 - Tratamento do RNA total por digestão enzimática de DNase

Três enzimas de fabricantes diferentes foram testadas para a realização da limpeza do RNA extraído. A princípio testou-se o protocolo do Kit RNase-Free DNase Set (Qiagen, Germany). De acordo com este protocolo, até 87,5 µL de amostra devem ser incubados com 2,5 µL de enzima e 10 µL de Tampão de enzima RDD, porém, para um mesmo volume de RNA, aumentou-se o volume da enzima para 5 µL. Para este produto é necessário, após a incubação

com a enzima à temperatura ambiente, a purificação da amostra pelo kit RNeasy Minelute Cleanup kit (Qiagen, Germany), afim de descartar os reagentes e a enzima utilizada para a digestão do DNA. A purificação baseia-se em sistema de colunas, nas quais existe um filtro de sílica que se liga às moléculas de RNA (>200 nucleotídeos) e permite a passagem dos contaminantes e solventes necessários para sua purificação durante os passos de centrifugação. Por fim, as moléculas de RNA já purificadas foram eluídas do filtro com a adição de 14 µL de água deionizada ultrapura livre de RNases, após uma centrifugação de rotação maior (14.000 x g por 1 minuto à temperatura ambiente). Optou-se, posteriormente, pela utilização de kits de DNase que não necessitassem do passo de purificação da amostra após a digestão com DNase. Assim, testamos os kits de enzimas da Invitrogen (DNase amplification Grade, Invitrogen, USA) e Promega (RQ1 RNase-Free DNase, Promega, USA). O princípio destes protocolos é fazer a digestão, em temperatura ambiente, de 1 µg de RNA diluídos em uma solução de 10 µL contendo, além do RNA, 1 µL de solução Tampão para a enzima (10 X) contendo 200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 20 mM MgCl₂, 500 mM KCl (DNase I Reaction Buffer, Invitrogen, USA) e pelo menos 1 µL de enzima (1 U/µl). Testamos o protocolo para as seguintes concentrações de enzima: 1 U/µL, 1,5 U/µL, 2 U/µL, 3 U/µL e 3,5 U/µL para a enzima da Invitrogen e 3,5 U/µL para a enzima da Promega. A solução foi incubada à temperatura ambiente por 15 minutos para a DNase Amplification Grade, da Invitrogen, e 30 minutos para a RQ1 RNase-Free DNase. Depois da incubação, a enzima foi inibida após a adição de um tampão com reagentes quelantes de Mg²⁺ (cofator de atividade das DNases) como o EDTA. (Stop Solution, Invitrogen, USA) e o EGTA (20 mM, RQ1 Stop Buffer, Promega, USA) e nova incubação à 65 °C por 10 minutos.

3.4 - Síntese da fita complementar (cDNA) a partir de RNA total após digestão com DNases

O cDNA das amostras foi sintetizado a partir do RNA total, utilizando a enzima *ImProm -II Reverse Transcriptase* e seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante (Promega, USA). A síntese de cDNA ocorre em duas etapas. Na primeira etapa de obtenção do cDNA utilizou-se 500 ng de RNA, 0.5 µg de oligo(dT)₁₅ (Promega, USA) e água deionizada estéril em um

volume final de 5 µL de reação. A solução foi incubada a 70 °C por 5 minutos, no intuito de desfazer as estruturas secundárias que o RNA possui (*“hairpins”*). Em seguida, o tubo contendo a reação foi colocado em um isopor com gelo durante 5 minutos. O oligo(dT) permite a transcrição reversa preferencial dos RNAs mensageiros, uma vez que a maioria destes possuem uma cauda 3' poliadenilada, para a qual o oligonucleotídeo é complementar. A segunda etapa da reação consistiu na adição de 60 nmol de MgCl₂ (25 mM), 5 nmol de dNTP (1,25 mM), 5 X Improm Buffer e 1 µL (1 U/µL) de *Improm-IITM Reverse Transcriptase* à primeira solução. As condições de ciclagem, criadas em termociclador são: primeiro passo a 25 °C por 5 minutos para hibridização do oligo(dT), um segundo passo a 42 °C por 1 hora para a síntese da fita de cDNA, e então 70 °C por mais 15 minutos para inativar a enzima transcriptase reversa.

3.5 – Avaliação da contaminação com DNA genômico: PCR convencional para o gene Glucuronidase Beta (*GUSB*)

Os oligonucleotídeos sintetizados para o gene *GUSB* são descritos a seguir: *senso* 5'-CTGCCACCAGGGACCATC-3' e *antissenso* 5'-CAGTCCAGCGTAGTTGAAAAG-3'. O fragmento esperado para a amplificação de DNA genômico deve conter 287 pares de base e o fragmento de amplificação de cDNA deve conter 102 pares de base. A reação de PCR foi padronizada segundo as seguintes condições de reação: Tampão MgCl₂ free 1 x (Invitrogen, CA, USA), 0,125 mM de dNTP (Invitrogen, CA, USA), 2,25 mM de MgCl₂ (Invitrogen, CA, USA), 0,2 µM de oligonucleotídeos (Dialab, Belo Horizonte, MG, Brazil), 0,5 U/µL de *Taq* DNA Polimerase e 1 µL de cDNA diluído 1:5. O volume final da reação foi de 10 µL. A reação foi então submetida às seguintes condições de ciclagem: 94 °C por 3 minutos, seguida por 35 ciclos de 94 °C por 40 s, 54,6 °C por 20 s, 72 °C por 30 segundos, uma extensão à 72 °C por 5 minutos e por fim 4 °C por tempo indeterminado. O produto amplificado foi então checado em gel de Agarose 1% utilizando tampão TBE 1 X [Tris-HCl a 45 mM, ácido bórico a 45 mM e EDTA a 1 mM (pH 8,0)], corado com brometo de Etídio (0,4mg/mL) e visualizado sob luz UV segundo condições previamente detalhadas.

3.6 - PCR em tempo-real

Após a análise dos genes diferencialmente expressos em estudos de *microarray* de pacientes com DA, foram encomendados ensaios de expressão *TaqMan*® (Applied Biosystems, CA, USA) para cada os genes *CALM1*, *KIF1B*, *FLOT1*, *HLA-B*, *CIRBP*, *S100A4*, *HLA-DRB1* e *ATP5J2* (Tabela 5). Com exceção do gene *HLA-B*, os outros genes possuem ensaios já manufaturados, de qualidade testada (Inventariado) e sonda fluorescente em região entre exons (sufixo _m1 designado na identidade do ensaio), evitando a quantificação de contaminantes, como DNA genômico.

Tabela 5 . Lista de Ensaios *TaqMan*® (Applied Biosystems, CA, USA) selecionados para a validação dos genes selecionados pela técnica de PCR em tempo-real.

Gene	Espécie	Identidade do Ensaio	Tamanho do fragmento
			Amplificado (pb)
<i>CALM1</i>	Homo sapiens	Hs00237233_m1	128
<i>KIF1B</i>	Homo sapiens	Hs01114511_m1	70
<i>FLOT1</i>	Homo sapiens	Hs00195134_m1	95
<i>HLA-B</i>	Homo sapiens	Hs00966073_g1	91
<i>CIRBP</i>	Homo sapiens	Hs00154457_m1	103
<i>S100A4</i>	Homo sapiens	Hs00243202_m1	101
<i>HLA-DRB1</i>	Homo sapiens	Hs99999917_m1	75
<i>ATP5J2</i>	Homo sapiens	Hs00934710_m1	61

pb: pares de bases.

A seguir, foram confeccionadas as curvas de eficiência para os ensaios *TaqMan* (Applied Biosystems) discriminados na tabela e para os ensaios dos controles endógenos. O cálculo da eficiência foi feito de acordo com a fórmula $E = 10^{(-1/a)} - 1$, sendo *a* o valor de inclinação da reta obtida a partir da curva de diluição (Pfaffl, 2001). A curva consiste de quatro pontos diluídos

(1:5, 1:10, 1:20, 1:50) a partir de um *pool* contendo cDNA extraídos de controles jovens. Os pontos da curva foram feitos em triplicata.

A seleção dos controles endógenos foi realizada a partir de *pool* contendo cDNA extraídos sangue periférico de controles jovens diluídos 5 vezes. As reações foram feitas em triplicata para três genes comumente testados como controles endógenos: Glucuronidase, Beta - *GUSB*, *Breaking Point Cluster Region* - *BCR* e *Tata-Box binding Protein* – *TBP*.

Os ensaios foram conduzidos no aparelho Applied Biosystems 7500 PCR System® (Applied Biosystems, CA, USA). A reação foi composta de 1,5 µL de amostra de cDNA diluída 5 vezes; 0,75 µL de *TaqMan Assays* 20 X (Applied Biosystems) e 7,5 µL de *TaqMan® Master Mix* (Applied Biosystems) em um volume final de 15 µL, segundo protocolo padronizado em nosso laboratório (Mendes *et al.*, 2008). O perfil de amplificação térmica conduzido constituiu-se em: aquecimento a 50 °C por 2 minutos para ativação da uracil-N-glicosilase (UNG), ativação da Taq Polimerase a 95 °C por 10 minutos e 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos e amplificação/extensão a 60 °C por 1 minuto. Os dados foram coletados durante o primeiro passo do estágio 3. Para diminuir os erros na estimativa do valor da expressão, cada amostra foi analisada em triplicata e o valor médio foi usado. Optou-se pela análise de cada gene em placas diferentes (2 placas por gene) como proposto por Hellemans e colaboradores (2007). Além disso, cada placa incluiu um controle negativo (*non-template control*) e um controle positivo de DNA genômico para detecção de traços de amplificação inespecífica, bem como uma amostra de cDNA calibrador, cuja amplificação foi monitorada em todas as placas realizadas e serviu como padrão normalizador entre as placas.

3.7 - Análise dos Dados

Os controles endógenos mais estáveis foram selecionados pelo programa Genorm (Primer Design), segundo descrito por Vandesompele e colaboradores (2002).

A análise dos resultados de amplificação obtidos foi desenvolvida no programa qBasePlus vs. 1.4 (Biogazelle, Ghent, Belgium), considerando o valor de dois ou mais controles endógenos

para a formulação do fator de normalização utilizado no cálculo posterior da Expressão Relativa dos genes-alvo. O Fator de Normalização é determinado pela média geométrica dos valores relativos de amplificação dos controles endógenos. O cálculo de expressão relativa dos genes-alvo foi efetuado de acordo com a fórmula: $ER = E^{-[FN \cdot (C_{tcal} - C_{tamt})]}$, no qual ER denota Expressão relativa; E denota eficiência de amplificação do gene alvo; FN denota fator de normalização calculado para os controles endógenos; C_{tcal} denota valor de amplificação da amostra calibradora e C_{tamt} denota valor de amplificação da amostra testada.

Foram realizados gráficos de distribuição amostral *Box-Plot* entre os grupos e a análise estatística conduzida foi o teste não paramétrico *Mann Whitney* para comparação entre dois grupos sem distribuição normal, a fim de se diminuir a influência de qualquer *outlier*, com auxílio do *Software SPSS Statistics* vs. 17 (SPSS inc., IBM, Chicago, Illinois, USA). A significância considerada foi de 95%.

4 – Estudo de Proteômica de plaquetas

4.1 - Padronização da extração de proteínas de plaquetas

Para os testes de padronização, foram utilizadas 300 µL de solução rica em plaquetas (concentração média de proteínas de aproximadamente 1 mg/mL) diluídas em Tampão Tris-Sacarose, e congeladas a -70 °C, previamente extraídas de pacientes com DA e seus respectivos controles, segundo protocolo já estabelecido em nosso laboratório.

Foram feitos três testes diferentes para a extração e troca de tampão das proteínas de plaquetas.

No primeiro teste, as amostras de plaquetas isoladas em tampão Tris-Sacarose foram submetidas a uma centrifugação (12.000 G; 15 min; 4 °C) para a lise das células e a precipitação das proteínas. Descartou-se o sobrenadante e o *pellet* de proteínas formado foi então diluído em 100 µL de um tampão de desnaturação contendo uréia 7 M (Sigma- Aldrich, MO, USA), tiouréia 2 M (Sigma- Aldrich, MO, USA), CHAPS 4% (m/v) (Amersham GE

Healthcare, USA), DTT 70 mM (Amersham GE Healthcare, USA) e coquetel inibidor de protease 1% (v/v) (*Sigma P8340*, Sigma- Aldrich, MO, USA).

No segundo teste, as amostras de plaquetas isoladas em tampão Tris-Sacarose foram transferidas para colunas de retenção de porosidade limite 3 KDa (*Microcon 3kda*, Millipore, MA, USA) e submetidas à centrifugação (12.000 G, 2h15min; 4 °C). O soluto filtrado foi descartado e 20 µL de tampão de desnaturação foi adicionado à coluna para a lavagem das proteínas retidas durante a próxima centrifugação (12.000 G, 2 h; 4 °C). Finalmente, após o descarte de soluto coletado após a filtração, adicionou-se 100 µL de tampão de desnaturação em um tubo coletor novo, acoplado à coluna. Assim, fez-se uma nova centrifugação (100 G, 5 min; 4 °C) com a coluna invertida, para que as proteínas retidas em seu interior decantassem e entrassem em contato com o tampão de desnaturação presente no tubo coletor. As proteínas foram então homogeneizadas.

No terceiro teste, as amostras de plaquetas isoladas em tampão Tris-Sacarose foram precipitadas com Ácido Tri-Cloroacético (TCA) 13% (v/v) (Merck, Darmstadt, Germany) e incubadas por 20 min a 4 °C. Em seguida fez-se a centrifugação (12.000 G; 15 min; 4 °C) e o descarte do sobrendante. Para eliminar resquícios de TCA, foi adicionado 1 mL de Acetona P.A. Gelada (Merck, Darmstadt, Germany), e em seguida as amostras foram incubadas a 4 °C por uma hora. Seguiu-se mais um passo de centrifugação (12.000 G; 15 min; 4 °C) e o posterior descarte do sobrenadante por inversão. Após a secagem do *pellet* na bancada, adicionou-se 100 µL de tampão de desnaturação, e as proteínas foram homogeneizadas de duas formas, ou por pipetagem ou por sonicação, com um Sonicador de haste metálica Vibracell (Sonics & Materials Inc, CT, USA).

4.2 - Integridade e quantificação das proteínas

A quantificação de proteínas foi feita de acordo com o método descrito por Bradford (1976), baseado em uma curva padrão de albumina de soro bovino (BSA) para determinar a concentração da amostra. A seguir, foi então adicionado igual volume de tampão de amostra Laemmli (Laemmli, 1970). Subseqüentemente, as amostras foram mantidas por 5 min em

banho-maria (95 °C). O equivalente a 3 µg de proteínas totais foram submetidas à eletroforese, com SDS, em gel de 12% de poliacrilamida. O gel foi corado com Comassie Brilliant Blue R-250 (Sigma -Aldrich, MO, USA) para a verificação da normalização e integridade das proteínas.

As amostras foram aliquotadas em *pools* de 500 µg de proteínas totais para a posterior focalização isoeletrica. Foram usadas cinco amostras de cada grupo (DA e controles) pareadas por idade para e separadas por diagnóstico e gênero.

4.3 - Eletroforese Bidimensional (Gel 2-DE)

4.3.1 - Foco Isoeletrico

A focalização isoeletrica (primeira dimensão) foi conduzida em tiras de poliacrilamida desidratadas de 18 cm com gradiente imobilizado de pH (IPG - *Immobilized pH Gradient*, Amersham GE Healthcare, USA) – 3 a 10 não-linear. As amostras foram solubilizadas em um tampão de reidratação contendo uréia 7 M (Sigma-Aldrich MO, USA), tiouréia 2 M (Sigma-Aldrich MO, USA), CHAPS 4% (m/v), DTT 70 mM (Amersham GE Healthcare, USA), anfólito 2% (v/v) (*IPG Buffer , pH 3-10 não linear*, Amersham GE Healthcare, USA) e azul de bromofenol 0.002% (m/v) (Amersham GE Healthcare, USA). As tiras IPG foram reidratadas em um suporte (*strip holder*) de tamanho correspondente a elas. A solução foi aplicada no suporte e a tira colocada sobre o tampão com a face contendo o gel para baixo. Sobre estas, 2 mL de óleo mineral (*Dry strip cover fluid*, Amersham GE Healthcare, USA) foram aplicadas a fim de evitar a cristalização da uréia. A reidratação seguiu a uma temperatura constante de 20 °C durante 12 horas. Imediatamente a seguir, foi iniciada a focalização isoeletrica que ocorreu em três etapas: 500 V por uma hora, 1000 V por uma hora e 8000 V até acumular 70 KVh. Ao final da focalização as tiras foram conservadas à temperatura de -70 °C antes de iniciar a segunda dimensão da eletroforese.

O tratamento das tiras de poliacrilamida permite a transição das proteínas previamente separadas pelo ponto isoelétrico (primeira dimensão) para a segunda dimensão da eletroforese em gel contendo SDS.

As tiras de poliacrilamida foram tratadas para redução das pontes dissulfeto durante 8 minutos empregando-se uma solução contendo Tris-HCl pH 8.8 50 mM, uréia 6 M, glicerol 30% (v/v) (Amersham GE Healthcare, USA), SDS 2% (m/v) (Amersham GE Healthcare, USA) e DTT 2% (m/v) (Amersham GE Healthcare, USA). Após este tratamento as tiras foram transferidas para uma segunda solução durante 12 minutos. Esta solução continha os mesmos componentes da primeira solução, substituindo-se o DTT 2% por Iodoacetamida 2,5% (Amersham GE Healthcare, USA) para alquilar as proteínas e prevenir sua reoxidação durante a eletroforese.

4.3.2 - Gel SDS-PAGE

A segunda dimensão da 2-DE foi realizada em um gel homogêneo de poliacrilamida 12,5% (m/v), de acordo com o método descrito por Laemmli (1970).

As tiras de poliacrilamidas previamente equilibradas foram colocadas sobre a superfície de um gel vertical homogêneo de poliacrilamida de dimensões (180 mm x 160 mm x 1 mm) e seladas com agarose 0,5% (m/v) a 70 °C. O gel foi preparado com uma solução de Acrilamida/Bis-Acrilamida (37,5: 1; m/m) em uma concentração de 12,5% (m/v), Tris HCl pH 8.8, SDS 0,1% (m/v), persulfato de amônio 0,05% (m/v) e TEMED 0,05% (v/v) (Amersham GE Healthcare, USA).

A corrida eletroforética foi realizada com o sistema SE-600 (Amersham GE Biosciences, USA) com refrigeração interna Multitemp II (Amersham GE Healthcare Biosciences, USA), a uma temperatura constante de 20 °C, em uma solução Tris-HCl 25 mM, Glicina 192 mM e SDS 0,1% (m/v). Na primeira etapa, a voltagem foi mantida em 60 V durante 30 minutos para que as proteínas penetrassem ao mesmo tempo no gel. Na segunda etapa, uma amperagem fixa de 30 mA foi aplicada até a frente de corrida visualizada pelo corante azul de bromofenol chegar ao final do gel, o que durou cerca de 4 horas.

4.3.3 - Coloração com Comassie Blue Coloidal

Finalizada a segunda dimensão, os géis foram lavados e as proteínas visualizadas por impregnação com Comassie Blue Coloidal, baseado no método descrito por Candiano e colaboradores (2004). Os géis foram tratados com as seguintes soluções: solução fixadora [Etanol 30% (v/v) e Ácido Fosfórico 2% (v/v)] por 5 horas no mínimo; lavagem com água deionizada por três vezes; solução corante [Ácido Fosfórico 10% (v/v), Sulfato de Amônio 10% (m/v) (Amersham GE Healthcare, USA), Metanol 20% (v/v), Comassie blue G 250 0,12% (m/v) (Sigma - Aldrich, MO, USA)], mantida sob agitação constante por 72 horas. O excesso de corante foi removido com uma lavagem de água deionizada por 1 hora, com trocas a cada 20 minutos.

4.3.4 - Análise da expressão protéica de géis corados com Coomassie Blue Coloidal

As imagens dos géis foram adquiridas e digitalizadas, em resolução de 300dpi (tons de cinza) utilizando-se um scanner específico (SharpeScanner JX, Sharp, Japan) para a aquisição de imagem por transmitância. As imagens obtidas foram armazenadas em formato TIFF (8 bits) para análise no *software* ImageMaster vs. 7 (GE Lifesciences, USA), específico para análise de géis 2-DE para a detecção, quantificação e comparação dos diferentes mapas 2DE corados com comassie blue coloidal. O uso do programa permitiu detectar diferenças de expressão de proteínas por meio do teste estatístico *Mann-Whitney* entre os dois grupos de géis, para a seleção dos *spots* diferencialmente expressos.

4.4 - Identificação das proteínas diferencialmente expressas

4.4.1 - Digestão protéica pela enzima Tripsina

A tripsina cliva sempre na porção C-terminal dos aminoácidos de lisina e arginina, gerando um padrão de fragmentos peptídicos muito típicos e específicos, podendo, posteriormente, serem identificados como pertencentes a uma determinada proteína, a partir de bancos de dados que possuam ferramentas de digestão virtual de proteínas.

A digestão das proteínas foi feita de acordo com o protocolo de Shevchenko *et al.*, 1996, com modificações. Neste protocolo os *spots* são recortados manualmente do gel, com o auxílio de uma lâmina de bisturi, e em seguida descoloridos com uma solução de metanol 50% (v/v), ácido acético 2,5% (v/v) em água deionizada ultrapura por 2 horas. A seguir é feita a desidratação dos *spots* descoloridos com solução de Acetonitrila 100% (Sigma-Aldrich MO, USA), seguido por uma reação de redução das proteínas com DTT 10 mM (Amersham GE Healthcare, USA) e alquilação das mesmas com Iodoacetamida 50 mM (Amersham GE Healthcare, USA). Por fim, é feita a digestão dos *spots* pela ação da enzima Tripsina Porcina (Sequence Grade, Promega, USA) de concentração final 20 ng/μL. Os *spots* banhados em 30-50 μL de tripsina são submetidos a um banho de gelo por 30 minutos para rehidratação dos *spots*, e por fim, encubação à 37 °C *overnight*.

A extração dos fragmentos peptídicos produto da digestão da tripsina é feita por uma solução de Ácido fórmico 5% (v/v), Acetonitrila 50% (v/v) em água deionizada ultrapura. Essas amostras foram concentradas até aproximadamente 2 μL via aparelho *Speed-Vac Plus* (Eppendorf, Germany).

4.4.2 - Identificação dos fragmentos peptídicos por espectrometria de massas

A matriz utilizada para aplicar as amostras na placa do espectrômetro de massa MALDI-TOF foi a α-ciano-4-hidroxicinâmico (Sigma – St. Louis, MO, USA). Essa matriz compõe uma solução cuja proporção sugerida por Corthals *et. al.*, (1999) é de 1,5% (m/v) da própria matriz, 60% (v/v) de Acetonitrila e 0,1% (v/v) de Ácido Trifluoroacético.

A matriz é uma substância que auxilia na ionização da amostra perante o agente ionizador (laser). Para identificação das amostras foi utilizada a técnica de *Peptide Mass Fingerprint* (PMF) em dois aparelhos diferentes: *Voyager™ DE-PRO MALDI-ToF* (Applied Biosystems – Foster City, CA, USA), do Laboratório de Proteoma do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da UNICAMP e o aparelho MALDI Q-ToF (*Waters Micromass* – Milford, MA, USA), do Laboratório de Biologia Molecular do CEBIME, Laboratório Nacional de Luz Sincrotron. A calibração interna foi feita com a utilização do padrão comercial *4700 Cal Mix*

(Applied Biosystems, USA). O processamento dos dados brutos obtidos nestes aparelhos foi feito utilizando o programa MASCOT DAEMON (Matrix Science, USA), repassando os resultados para os programas *Expasy-Aldente* (www.expasy.org/tools/aldente), MASCOT DISTILLER (Matrix Science, USA) e *Protein Lynx* (Waters, USA) o qual fazia a busca de proteínas em bancos de dados utilizando-se do algoritmo MASCOT (Matrix Science, USA). A identificação das proteínas realizou-se após a comparação dos fragmentos detectados com os valores teóricos existentes em bancos de dados públicos de proteínas, mais especificamente o *SWISS-PROT*. O parâmetro para essa busca foi de no mínimo de cinco *hits*, isto é, que ao menos quatro peptídeos obtidos experimentalmente apresentariam correspondência teórica com um erro máximo de 100 ppm.

IV – Resultados

1 - Seleção de Genes diferencialmente expressos a partir da literatura

Foram selecionados 14 estudos que utilizaram a técnica de microarray em pacientes com DA. Metade desses estudos utilizou plataformas da *Affymetrix* (Affymetrix Inc, CA, USA), (Colangelo *et al.*, 2002; Yao *et al.*, 2003; Dunckley *et al.*, 2006; Katsel *et al.*, 2007; Parachikova *et al.*, 2007; Brooks *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2007), sendo que 3 estudos utilizaram o mesmo subtipo U133A (Dunckley *et al.*, 2006; Katsel *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2007) e 2 o subtipo U95A (Colangelo *et al.*, 2002; Parachikova *et al.*, 2007). Um estudo utilizou plataforma da *Clontech* (Ricciarelli *et al.*, 2004), outro da *Incyte Pharmaceuticals* (Hata *et al.*, 2001), e outro da *Agilent* (Weeraratna *et al.*, 2007). Quatro estudos obtiveram plataformas desenvolvidas em centros tecnológicos ou de pesquisa (Walker *et al.*, 2004; Scherzer *et al.*, 2004; Emilsson *et al.*, 2006; Maes *et al.*, 2007).

Dos 12 estudos que trabalharam com tecido cerebral, 6 utilizaram regiões corticais específicas de cada paciente, sendo 3 estudos em córtex frontal (Ricciarelli *et al.*, 2004; Emilsson *et al.*, 2006; Walker *et al.*, 2004), 1 em córtex entorrinal (Dunckley *et al.*, 2006), 1 em córtex pré-frontal (Parachikova *et al.*, 2007) e 1 estudo em *pools* de córtex total de amostras de pacientes (Katsel *et al.*, 2007). Além disso, 1 estudo utilizou RNA extraído a partir dos lobos parietais de seus pacientes (Weeraratna *et al.*, 2007); 5 estudaram material de hipocampo (Hata *et al.*, 2001; Parachikova *et al.*, 2007; Collangelo *et al.*, 2002; Brooks *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2007) e 1 de *pool* de tecido cerebral total de pacientes (Yao *et al.*, 2003). Dois artigos utilizaram sangue periférico como matriz de pesquisa, dos quais 1 analisou material de células mononucleadas (Maes *et al.*, 2007) e o outro, células nucleadas (linfócitos, principalmente) (Scherzer *et al.*, 2004) (Tabela 6).

O número médio de pacientes utilizados para os estudos de expressão gênica em tecido cerebral foi de 19 indivíduos (mínimo: 4; máximo: 61), sendo aqueles estudos envolvendo tecido cortical obtiveram, em média, 27 indivíduos (mínimo: 4; máximo: 61) e os estudos

envolvendo tecido hipocampal obtiveram, em média, 8 indivíduos (mínimo: 4, máximo: 16). Ambos os estudos envolvendo células sanguíneas utilizaram 14 pacientes cada para a obtenção de RNA.

Tabela 6. Artigos utilizados para fins comparativos, discriminando-se a plataforma de Microarray utilizada, tecido analisado, casuística e número de genes identificados como diferencialmente expressos nos pacientes com DA.

Autor	Periódico	Plataforma	Tecido	Casuística	Nº de genes diferencialmente expressos	
					Hiper-expressos	Hipo-expressos
Dunckley, T	<i>Neurobiology of Aging</i> , 2006	Affymetrix (U133A arrays e U133 plus 2.0 arrays)	Córtex Entorrinal	17 pacientes/ 14 controles	4	3
Ricciarelli, R	<i>IUBMB Life</i> , 2004	Atlas Human Microarray 12K (Clontech, GE Healthcare)	Córtex Frontal	6 pacientes/ 6 controles	11	12
Katsel, P	<i>Neurochemistry Research</i> , 2007	Affymetrix (UG-U133A e B GeneChip)	Córtex Frontal, Parietal, Cingulado, Temporal, Occipital e Hipocampo	82 pacientes/ 16 CCLs/ 18 controles	14 (córtices) 2 (hipocampo)	9 (córtices) 2 (hipocampo)
Emilsson, L	<i>Neurobiology of Disease</i> , 2006	UU (University of Uppsala) ; RIT (Royal Institute of Technology)	Córtex frontal (Brodmann 8 e 9)	61 pacientes/ 53 controles	1	2
Parachikova, A	<i>Neurobiology of Aging</i> , 2007	Affymetrix (U95Av2 GeneChip)	Córtex Pré-Frontal e Hipocampo	10 pacientes/ 14 controles	56 (córtex) 5 (hipocampo)	10 (córtex); 10 (hipocampo)
Walker, PR	<i>Artificial Intelligence in Medicine</i> , 2004	19K (The Medical Center of the University Health Network, Toronto, Canada)	Córtex Frontal	4 pacientes/ 5 controles	7	1
Weeraratna, A	<i>Experimental Cell Research</i> , 2007	Agilent Human 44K	Lobo Parietal Inferior	10 pacientes/ 10 controles	28	28
Yao, P	<i>Neurobiology of Disease</i> , 2003	Affymetrix (HuFL high density oligonucleotide array)	Homogenato total cerebral	13 pacientes/ 11 controles	0	3
Colangelo, V	<i>Journal of Neuroscience</i> , 2002	Affymetrix (GeneChip Test 3 e Human U95Av2)	Hipocampo (CA1)	7 pacientes/ 6 controles	19	18
Brooks, WM	<i>Brain Research</i> , 2007	Affymetrix (GeneChip HC- U133A)	Hipocampo	6 pacientes/ 7 controles	0	4
Hata, R	<i>Biochemical and Biophysical Research Communications</i> , 2001	Incyte Pharmaceuticals (Unigem V)	Hipocampo	4 pacientes/ 4 controles	20	20
Xu, PT	<i>Neurobiology of Disease</i> , 2006	Affymetrix (U133A arrays)	Hipocampo (CA1 a CA4)	16 pacientes/4 controles	32	111
Scherzer, CR	<i>Archives of Neurology</i> , 2004	Human UniGEM V complementary DNA microarrays	Linfócitos totais	14 pacientes/ 9 controles	1	5
Maes, OC	<i>Neurobiology of Aging</i> , 2007	NIA Human MGC cDNA clone microarray- National Cancer Institute's Mammalian gene collection	Células sanguíneas Mononucleadas	14 pacientes/ 14 controles	19	136

Em 10 artigos (Collangelo *et al.*, 2002; Yao *et al.*, 2003; Ricciarelli *et al.*, 2004; Walker *et al.*, 2004; Scherzer *et al.*, 2004; Emilsson *et al.*, 2006; Dunckley *et al.*, 2006; Katsel *et al.*, 2007; Brooks *et al.*, 2007; Weeraratna *et al.*, 2007) foram disponibilizados apenas as listas de alguns dos genes diferencialmente expressos selecionados segundo os critérios dos autores. Os demais genes diferencialmente expressos com significância estatística disponíveis nos *arrays* não puderam ser comparados.

No total, os 14 artigos analisados apresentaram, em conjunto, 593 genes diferencialmente expressos com significância estatística. Destes, 219 estavam na condição de hiper-expressão para DA e 374 estavam hipo-regulados em DA. Entretanto, deste universo, apenas 8 genes mostraram a mesma condição de expressão diferencial em pelo menos dois estudos. Assim, foram selecionados, de acordo com o critério estabelecido por este projeto, 2 genes hiper-expressos (*CIRBP*, *S100A4*) e 4 hipo-expressos (*CALM1*, *ATP5J2*, *KIF1B*, *FLOT1*) em pacientes portadores de DA (Tabela 7). Dos estudos que apresentaram pelo menos um gene coincidente com outra publicação, três utilizaram tecido hipocampal *post-mortem* para a análise de expressão gênica (Hata *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2006; Parachikova *et al.*, 2007) enquanto um utilizou células sanguíneas mononucleadas (Maes *et al.*, 2007). Os genes diferencialmente hiper-expressos são provenientes de estudos envolvendo exclusivamente tecido hipocampal (*CIRBP* e *S100A4*) ou tecido hipocampal e cortical (*HLA-DRB1* e *HLA-B*). Já dentre os genes diferencialmente hipo-expressos, o gene *CALM1* foi encontrado em dois estudos envolvendo tecido hipocampal enquanto que *ATP5J2*, *KIF1B* e *FLOT1* foram encontrados em um estudo realizado a partir de material hipocampal e outro realizado a partir de células sanguíneas.

Tabela 7. Genes cuja expressão diferencial em pacientes com DA se confirmou em pelo menos dois artigos de grupos diferentes que utilizaram a técnica de microarray. Esses genes foram selecionados nesse estudo para validação por PCR em tempo-real em RNA extraído a partir de sangue periférico de pacientes com DA

Genes Hipo-expressos	Processos Celulares	Tecido de Estudo	Referências	Genes Hiper-expressos	Processos Celulares	Tecido de Estudo	Referências
<i>CALM1</i> (Calmodulina 1, fosforilase quinase delta)	Transdução de sinal; síntese e liberação de neurotransmissores	Hipocampo/ Córtex	Xu <i>et al.</i> , 2006; Parachikova <i>et al.</i> , 2007	<i>HLA-DRB1</i> (Complexo de Histocompatibilidad e Maior, classe II, DR Beta 1)	Resposta Imune (HLA classe II)	Hipocampo/ Córtex	Xu <i>et al.</i> , 2006; Parachikova <i>et al.</i> , 2007
<i>ATP5J2</i> (ATP sintase, transportador de H ⁺ , complexo F0 mitocondrial, subunidade F2)	Síntese de ATP	Hipocampo/ Leucócitos	Xu <i>et al.</i> , 2006; Maes <i>et al.</i> , 2007	<i>HLA-B</i> (Complexo de Histocompatibilidad e Maior, classe I, B)	Resposta Imune (classe I)	Hipocampo/ Córtex	Xu <i>et al.</i> , 2006; Parachikova <i>et al.</i> , 2007
<i>KIF1B</i> (Cinesina da família 1 Beta)	Transporte celular de mitocondrias e vesículas sinápticas	Hipocampo/ Leucócitos	Xu <i>et al.</i> , 2006; Maes <i>et al.</i> , 2007	<i>CIRBP</i> (Proteína de Ligação a RNA Induzida por Frio)	Supressão da proliferação Celular; Supressão de apoptose; Atividade circadiana	Hipocampo/ Hipocampo	Xu <i>et al.</i> , 2006; Parachikova <i>et al.</i> , 2007
<i>FLOT1</i> (Flotilina 1)	Tráfego vesicular (formação de caveolas)	Hipocampo/ Leucócitos	Xu <i>et al.</i> , 2006; Maes <i>et al.</i> , 2007	<i>S100A4</i> (S100 proteína ligante de Cálcio A4)	Ligante de RAGE; Inflamação; Cicatriz glial após injúria	Hipocampo/ Hipocampo	Hata <i>et al.</i> , 2001; Parachikova <i>et al.</i> , 2007

2 - Estudos de expressão gênica de leucócitos

2.1 - Padronização da técnica de extração de RNA a partir de leucócitos de sangue periférico

2.1.1 - Protocolo de isolamento de leucócitos por lise de hemácias

Os primeiros testes realizados em nosso laboratório foram conduzidos de acordo com o recomendado no primeiro protocolo, como descrito no item III - Material e Métodos, subitem 3.1. Assim sendo, as amostras de sangue eram submetidas a apenas um passo de adição da solução de lise de hemácias e apenas um passo de centrifugação para a separação dos leucócitos e hemácias. Obtiveram-se *pellets* de leucócitos de cor avermelhada, o que indicava a presença de eritrócitos lisados, o que provavelmente veio a interferir na qualidade do RNA obtido no final dessas extrações. Nos testes observamos RNA com contaminação genômica (Figura 6 A) e ou degradado (Figura 6 B).

Figura 6. Eletroforese em gel de Agarose 1%, corado com 4 μ L de Brometo de Etídio (0,4 μ g/ μ L) visualizado em luz UV para a checagem do teste de extração de RNA de leucócitos de sangue periférico utilizando-se o método de lise de hemácias com tampão de lise (155 mM de NH_4Cl e 15 mM de NH_4HCO_3) e depois o método TRIzol® (Invitrogen, CA, USA). A mesma amostra de controle voluntário do laboratório foi aliquoteada em quatro tubos. (A) As setas indicam as bandas de DNA genômico contaminante (superior) e das subunidades ribossomais 28S (meio) e 18S (inferior). A extração também mostrou instabilidade, evidenciada pela amostra de número 3, na qual o RNA mostra-se degradado. (B) Neste caso não se pode ver as bandas das subunidades do ribossomo, o fim do gel está marcado por uma concentração forte de RNA degradado apontado pela seta, dando a aparência de uma banda. Além disso, há também contaminação com DNA genômico, visível na região superior do gel.

Assim optou-se por repetir por mais duas vezes o passo de adição de solução de lise de hemácias, na tentativa de se eliminar o as células vermelhas lisadas que depositavam junto com os leucócitos. Como resultado, obteve-se uma extração mais estável, ou seja, RNA aparentemente de mesma qualidade para todas as amostras extraídas. Entretanto, assim como aumentou a quantidade de RNA obtido, o mesmo aconteceu para o DNA genômico; a banda contaminante apresentou maior intensidade no gel, em comparação com as outras extrações (Figura 7).

Figura 7. Eletroforese em gel de Agarose 1%, corado com 4 μ L de Brometo de Etídio (0,4 μ g/ μ L) e visualizado em luz UV para a checagem do teste de extração de RNA de leucócitos de sangue periférico utilizando-se o método de lise de hemácias com tampão de lise (155 mM de NH_4Cl e 15 mM de NH_4HCO_3) e depois o método TRIzol® (Invitrogen, CA, USA). As setas indicam as bandas de DNA genômico contaminante (superior) e das subunidades ribossomais 28S (meio) e 18S (inferior).

Devido ao grau elevado de contaminação com DNA genômico, as amostras extraídas não foram quantificadas e esse protocolo foi descartado.

2.1.2 - Protocolo de isolamento de leucócitos pelo método Ficoll-Paque™

No segundo protocolo descrito no item III- Material e Métodos, subitem 3.1, usou-se Ficoll-Paque™ (Amersham Bioscience, NJ, USA) como reagente para a realização do isolamento dos leucócitos após a coleta do sangue. Esse protocolo mostrou-se mais consistente e replicável

do que o protocolo anterior. As amostras extraídas apresentaram um grau de pureza e integridade superior ao das amostras extraídas de acordo com o protocolo anterior (Figura 8).

Figura 8: Eletroforese em gel de Agarose 1%, corado com 4 μ L de Brometo de Etídio (0,4 μ g/ μ L) e visualizado em luz UV para a checagem do teste de extração de RNA de leucócitos de sangue periférico utilizando-se o método Ficoll-Paque (Amersham Bioscience, NJ, USA) e depois o método TRIzol® (Invitrogen, CA, USA). (A e B). As setas indicam as bandas das subunidades ribossomais 28S (superior) e 18S (inferior). Este segundo teste provou que o método não gera resultados instáveis como o primeiro protocolo, o padrão de extração para todos os testes foi semelhante.

A quantificação das amostras teste revelou uma concentração média de RNA em torno de 200 ng/ μ L e massa total de aproximadamente 2 μ g por amostra de RNA por paciente, considerado suficiente para a condução dos experimentos de expressão gênica subsequentes.

2.2 - Extração de RNA a partir de leucócitos de sangue periférico dos pacientes e controles

A concentração de RNA média obtida a partir de 2 mL de sangue coletado por paciente foi de 282,42 ng/ μ L para o grupo DA e 261,55 ng/ μ L para o grupo controle. A média de qualidade obtida para a razão OD260/230 foi de 1,42 para o grupo DA e 1,54 para o grupo controle, evidenciando uma razão média baixa, característica em extrações de RNA de sangue, devido aos reagentes fenólicos e EDTA utilizados durante este processo. Já a razão de absorbância OD260/280 para o grupo DA (1,88) e o grupo controle (1,80) é considerada aceitável para a

condução dos experimentos. A massa em μg obtida por indivíduo também se mostrou satisfatória para ambos os grupos (14,63 μg para o grupo DA e 11,38 μg para o grupo controle) (Tabela 8).

Tabela 8. Distribuição dos indivíduos dos grupos DAs e Controles de acordo com as propriedades das amostras de RNA de leucócitos extraídas.

	DAs	Controles
Concentração média de RNA obtido por amostra (ng/uL)	282,42	261,55
Média da massa (μg) de RNA total por indivíduo	14,63	11,38

Verificou-se a integridade das amostras de RNA extraídas por Eletroforese, e todas apresentaram as duas bandas distintas e características 28S e 18S ribossomais, bem como o esperado arraste entre as bandas. Em alguns casos, foi possível observar bandas de contaminação por DNA genômico (Figura 9).

Figura 9. Gel de Agarose 1% corado com Brometo de Etídio (0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e visualizado em luz UV para a verificação da integridade do RNA. As setas indicam as bandas das subunidades ribossomais 28S (superior) e 18S (inferior). Os números referem-se às amostras de pacientes e controles do ambulatório. Pode-se observar, na amostra 4, a presença de uma pequena banda de DNA genômico.

Temos como regra em nosso laboratório analisar a presença desta contaminação após a síntese de cDNA, por via de uma PCR convencional para um par de oligonucleotídeos sintetizados entre exons do gene *GUSB*. O fragmento amplificado a partir de cDNA deve conter

102 pares de base (bp) e o fragmento amplificado a partir de uma matriz de DNA genômico deve conter 287 pares de base. Inicialmente a síntese de cDNA e PCR foi realizada para amostras de voluntários jovens de nosso laboratório e que aparentemente não apresentavam contaminação visível nas figuras de géis de agarose para a verificação da integridade de RNA. Foi possível, então, concluir que existe contaminação por DNA genômico, mas que na grande maioria das amostras, a sua percepção só se tornou possível após os ciclos de amplificação proporcionados pela PCR (Figura 10). O que reforça a necessidade de tratamento com DNase como etapa-padrão após a extração de RNA.

Figura 10. Gel de Agarose 1% corado com Brometo de Etídio (0,4 µg/µL) e visualizado em luz UV para a PCR convencional para o gene *GUSB*, evidenciando a contaminação das amostras de RNA, embora nem sempre perceptíveis no gel de agarose feito para a verificação da extração. As setas apontam os fragmentos amplificados, sendo a superior referente ao fragmento mais pesado, de 287bp, produto da amplificação de DNA genômico, e o inferior, mais leve, de 102 bp, produto de cDNA. L: padrão molecular de 100 bp. 1, 2 e 3: amostras de voluntário jovens do laboratório utilizadas para o teste de verificação de contaminação. 4: controle negativo; 5: controle positivo para DNA genômico.

2.3 - Tratamento do RNA total por digestão enzimática de DNase

Inicialmente testou-se o sistema de digestão e purificação de amostras de RNA do kit RNeasy Minelute Cleanup (Qiagen, Germany), com 1 unidade de enzima por microlitro de reação (Figura 11 A) e 5 unidades de enzima por microlitro de reação (Figura 11 B) como sugerido pela assistência técnico-científica do fabricante. Em nenhum dos casos houve limpeza total da amostra e durante o processo de purificação perdeu-se parte considerável da amostra, o que também é previsto pelo fabricante. Testou-se, então, as enzimas dos fabricantes Invitrogen

para 1 unidade (Figura 12 C); 1,5 unidades (Figura 12 D); 2 unidades (Figura 12 D) e 3,5 unidades por microlitro de reação (Figura 13), e Promega para 3,5 unidades por microlitro de reação (Figura 13). Com estes kits a perda de amostra foi menor e os testes com 3,5 unidades de enzima por amostra mostraram-se efetivos, eliminando a contaminação com DNA genômico da maioria das amostras. Não foi possível aumentar ainda mais a quantidade de enzima por amostra por recomendações do fabricante. Segundo o protocolo 3,5 Unidades é o máximo de enzima tolerável para digestão do DNA genômico sem o comprometimento das amostras para a realização de síntese de cDNA e PCR em tempo-real. De fato, na Figura 13 é possível observar que os fragmentos amplificados de cDNA para o gene *GUSB* tem intensidades diferentes, apesar da síntese ter partido de 500 ng de RNA em todas as amostras. A alta concentração de EDTA no tampão de inibição da DNase pode ser um dos fatores que interfere tanto na síntese de cDNA quanto na PCR. Este fato é melhor evidenciado nos fragmentos cuja digestão foi efetuada pela enzima RQ1 da Promega, evidenciando comprometimento da amplificação do fragmento de cDNA em alguns casos.

Figura 11. Géis de Agarose 1% corados com Brometo de Etídio (0,4 µg/µL) e visualizado em luz UV para a PCR convencional para o gene *GUSB* após a purificação com o Kit RNeasy Minelute Cleanup (Qiagen, Germany) com 1 unidade de enzima por reação (A) e 5 unidades de enzima por reação (B). As setas apontam os fragmentos amplificados, sendo a superior referente ao fragmento mais pesado, de 287 bp, produto da amplificação de DNA genômico, e o inferior, mais leve, de 102 bp, produto de cDNA. L: padrão molecular de 100 bp. Em A e B - 1, 2, 5, 6 e 7: amostras de voluntários do laboratório; 3 e 8: controles negativos; 4 e 9: controles positivos para DNA genômico.

Figura 12. Géis de Agarose 1% corados com Brometo de Etídio (0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e visualizado em luz UV, para a PCR convencional para o gene GUSB após a purificação com a enzima DNase amplification Grade, (Invitrogen, USA) com 1 unidade de enzima por reação (C), e 1,5 unidades de enzima por reação (D, dos números 5 a 12) e 2,0 unidades de enzima por reação (D, dos números 13 a 20). As setas apontam os fragmentos amplificados, sendo a superior referente ao fragmento mais pesado, de 287 bp, produto da amplificação de DNA genômico, e o inferior, mais leve, de 102 bp, produto de cDNA. L: padrão molecular de 100 bp. 1, 2, 5 a 20: amostras de voluntários do laboratório; 3 e 21: controles negativos; 4 : controle positivo para DNA genômico.

Figura 13. Gel de Agarose 1% corado com Brometo de Etídio (0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e visualizado em luz UV para a PCR convencional para o gene GUSB após a purificação com a enzima DNase amplification Grade, (Invitrogen, USA) e RQ1 RNase free DNase (Promega, USA) com 3,5 unidades de enzima por reação. As setas apontam os fragmentos amplificados, sendo a superior referente ao fragmento mais pesado, de 287 bp, produto da amplificação de DNA genômico, e o inferior, mais leve, de 102 bp, produto de cDNA.. A letra L designa padrão molecular de 100 bp. 1 a 7: amostras de voluntários do laboratório cuja digestão se deu pela enzima DNase Amplification Grade; 8 a 14: amostras de voluntários do laboratório cuja digestão se deu pela enzima RQ1 RNase free DNase; 15: controle negativo; 16: controle positivo para DNA genômico. É possível observar que as bandas referentes a amplificação de DNA genômico desapareceram para quase todas as amostras, excluindo-se as amostras 1, 4 e 8. As amostras 9 e 12 tiveram sua amplificação comprometida.

2.4- Avaliação da expressão dos genes selecionados

Dos oito ensaios *TaqMan*® encomendados para as validações por PCR em tempo-real, sete possuem sonda fluorescente cujos oligos que a compõe foram sintetizados com complementariedade a regiões entre dois exons dos genes estudados, ou seja, a sonda hibridiza, durante o ciclo de amplificação, com uma sequência somente obtida com a junção dos dois exons, após o processamento do RNA maduro e portanto, só existente no cDNA da amostra. Mesmo assim, a fim de evitar falsos positivos, optou-se por utilizar, em todas as placas de corrida, um controle positivo de DNA genômico capaz de detectar qualquer amplificação inespecífica.

2.4.1 - Curva de eficiência

Dos oito genes selecionados como gene alvo, seis foram avaliados (*CALM1*, *ATP5J2*, *KIF1B*, *FLOT1*, *CIRBP* e *S100A4*). A amplificação do gene *HLA-B* sofreu influência da amplificação genômica e o ensaio *HLA-DRB1* não apresentou curva de amplificação, e não puderam ser avaliados.

Inicialmente, fez-se a curva de eficiência de reação de todos os ensaios escolhidos para os genes alvo e também para os genes escolhidos como prováveis controles internos. Cada curva contou com a amostra de um *pool* de cDNAs de amostras de controles jovens do laboratório, diluída em 5, 10, 20 e 50 vezes analisadas em triplicata. A eficiência obtida para os genes alvo foi de 1,87 para *CALM1*; 1,968 para *ATP5J2*; 1,985 para *KIF1B*; 1,952 para *FLOT1*; 1,968 para *CIRBP* e 1,98 para *S100A4*. Para os genes endógenos a serem selecionados, a eficiência calculada foi de 2,44 para *GUSB*; 1,79 para *BCR* e 1,938 para *TBP*.

2.4.2 - Seleção dos controles endógenos

De acordo com Vandesonpele e colaboradores, em um estudo publicado em 2002, dada a possibilidade de variação dos genes selecionados como controles internos da reação de PCR em tempo-real a depender da matriz utilizada, é necessário avaliar sua estabilidade em um dado tecido antes de utilizá-lo para a normalização dos resultados de expressão. Além disso,

visto que existe variação nos dados de expressão de um dado controle endógeno em uma população de estudo, a possibilidade de se usar mais de um gene como controle interno traria maior robustez e confiabilidade à normalização dos dados de expressão. Assim, o grupo de Vandesonpele criou um algoritmo capaz não somente de avaliar o coeficiente de variação de expressão de genes, como também um algoritmo capaz de selecionar os melhores controles endógenos para serem utilizados como controles para um dado tecido. Para a realização da normalização da expressão, basta efetuar a média geométrica dos valores de expressão dos controles internos de uma mesma amostra, criando-se assim o fator de normalização daquela amostra.

Para este estudo, selecionamos inicialmente três controles endógenos: *GUSB*, *TBP* e *BCR*. Pela análise do coeficiente de eficiência de reação e padrão de expressão do *pool* de amostras de controles jovens, o programa Genorm gera uma planilha com os genes mais e menos instáveis. Segundo o programa, o gene considerado com menor estabilidade de expressão (*M*) para as amostras foi o *GUSB* (*M*= 0,619), o gene *BCR* foi o que apresentou valor intermediário (*M*=0,451) enquanto que o gene considerado com maior estabilidade de expressão foi o *TBP* (*M*= 0,444). Baseado nesses valores, o programa seleciona os genes mais estáveis para a condução dos experimentos (Figura 14). Tais coeficientes foram considerados adequados para a condução dos experimentos, pois estão dentro do valor de estabilidade de expressão aceitável para matrizes complexas ($M \leq 1$), como sangue, de acordo com Hellemans e colaboradores (2007). Selecionamos, então, os genes *TBP* e *BCR* como os controles endógenos mais estáveis para a análise da expressão relativa em RNA extraído a partir de sangue periférico.

Figura 14. Estabilidade Média considerada para os genes endógenos testados pelo programa Genorm.

2.4.3 - Análise da diferença de amplificação das amostras para os genes-alvo

As análises de amplificação das amostras de pacientes e controles foi conduzida no programa qBasePlus vs. 1.4 (Biogazelle, Ghent, Belgium). O programa normaliza os valores de amplificação das amostras de um mesmo gene dispostas em diferentes placas, permitindo compará-las, e gera o coeficiente de variação (CV) de expressão entre as amostras para os controles endógenos, no caso, 25%, considerado válido para tecidos heterogêneos como sangue (Tabela 9). Por fim, o programa executou automaticamente a normalização e cálculo de expressão relativa para os genes-alvo (Figura 15).

Tabela 9. Coeficiente de Variação dos genes endógenos determinado pelo programa qBasePlus vs.1.4 (Biogazelle, Ghent, Belgium).

	Coeficiente de Variação
TBP	0,252
BCR	0,253
Média	0,253

Figura 15. Interface do programa qBasePlus (Biogazelle, Ghent, Belgium). O programa realiza a calibração dos valores das placas, cálculo do fator de normalização e os cálculos de Expressão Relativa de acordo com a denominação dos genes-alvo (*Targets of Interest*) e genes-endógenos (*Reference Targets*).

Posteriormente, os valores de expressão relativa gerados foram analisados utilizando-se o programa estatístico SPSS vs. 17 (SPSS inc., IBM, Chicago, Illinois, USA). Foram confeccionados os gráficos *Box-Plot* de padrão de distribuição dos valores de cada gene para os grupos controle e DA (Figuras 16-21). Pode-se perceber que o padrão de distribuição dos valores relativos de expressão para os grupos DA é mais variado do que o padrão de distribuição de valores no grupo controle para os diferentes genes. Algumas amostras apresentaram, para os diferentes ensaios, valores superiores aos expostos nos quartis, sendo apresentadas como pontos pretos (valor de observação máxima) ou asteriscos (*outliers*).

Figura 16. Distribuição dos valores relativos de expressão para o gene *CALM1* nos grupos controles e DA total. Os asteriscos determinam amostras com valores de expressão fora da média de distribuição, denominados *outliers*. As barras horizontais determinam a mediana do grupo. As barras verticais identificam erro padrão da média dos grupos.

Figura 17. Distribuição dos valores relativos de expressão para o gene *FLOT1* nos grupos controles e DA total. As amostras determinadas pelos pontos pretos apresentam valor acima dos considerados pelos quartis (valor máximo observado). Os asteriscos determinam amostras com valores de expressão fora da média de distribuição, denominados *outliers*. As barras horizontais determinam a mediana do grupo (2º percentil ou 50%). As barras verticais identificam erro padrão da média dos grupos.

Figura 18. Distribuição dos valores relativos de expressão para o gene *CIRBP* nos grupos controles e DA total. A amostra determinada pelo ponto preto apresenta valor acima dos considerados pelos quartis (valor máximo observado). As barras horizontais determinam a mediana do grupo (2º percentil ou 50%). As barras verticais identificam erro padrão da média dos grupos.

Figura 19. Distribuição dos valores relativos de expressão para o gene *ATP5J2* nos grupos controles e DA total. As amostras determinadas pelo ponto preto apresentam valor acima dos considerados pelos quartis (valor máximo observado). As barras horizontais determinam a mediana do grupo (2º percentil ou 50%). As barras verticais identificam erro padrão da média dos grupos.

Figura 20. Distribuição dos valores relativos de expressão para o gene *FLOT1* nos grupos controles e DA total. A amostra determinada pelo ponto preto apresenta valor acima dos considerados pelos quartis (valor máximo observado). O asterisco determina amostra com valor de expressão fora da média de distribuição, denominado *outlier*. As barras horizontais determinam a mediana do grupo (2º percentil ou 50%). As barras verticais identificam erro padrão da média dos grupos.

Figura 21. Distribuição dos valores relativos de expressão para o gene *FLOT1* nos grupos controles e DA total. A amostra determinada pelo ponto preto apresenta valor acima dos considerados pelos quartis (valor máximo observado). As barras horizontais determinam a mediana do grupo (2º percentil ou 50%). As barras verticais identificam erro padrão da média dos grupos.

Também pelo programa SPSS, fez-se a análise estatística dos valores de expressão relativa obtidos para os genes. Devido ao número amostral reduzido a existência de amostras *outliers* evidenciadas pelos gráficos *Box-Plot* gerados, optou-se por realizar a análise não paramétrica dos dados, com o auxílio do teste *Mann-Whitney*.

Dentre os genes analisados, três (*ATP5J2*, *S100A4* e *KIF1B*) apresentaram expressão aumentada no grupo DA em relação ao grupo controle ($p > 0,05$). Esta significância estatística manteve-se tanto entre controles e DA total quanto entre controles e DA medicado ($n=17$) (Tabela 10).

Tabela 10. Média dos valores de Expressão, soma de postos e valor de significância de cada gene nos grupos Controles, DA total, DA medicado e DA não –medicado com respectivos erros padrões por grupo. Foi aplicado *Mann-Whitney* para verificar diferenças entre os grupos Controles e DA total e Controles e DA medicado. Foram considerados significativos os resultados de $p < 0,05$ (apontados em negrito e asterisco).

Genes	Valores de expressão nos grupos				
	Mediana Ctrl (n=20)	Mediana DAtt (n=20)	p valor	Mediana DAmed (n=17)	p valor
<i>CALM1</i>	0,7500 (SE±0,077)	0,9200 (SE±0,478)	p=0,415	0,8985 (SE±0,5608)	p=0,408
<i>FLOT1</i>	0,8425 (SE±0,1321)	1,0050 (SE±0,1752)	p=0,465	1,2030 (SE±0,2011)	p=0,408
<i>CIRBP</i>	0,9885 (SE±0,7129)	1,2450 (SE±0,1460)	p=0,279	1,2570 (SE±0,1698)	p=0,272
<i>ATP5J2</i>	0,6950 (SE±0,7461)	1,1280 (SE±0,1465)	p=0,004*	1,0815 (SE±0,1263)	p=0,016*
<i>S100A4</i>	0,7255 (SE±0,9505)	0,9690 (SE±0,2767)	p=0,008*	0,9220 (SE±0,3269)	p=0,014*
<i>KIF1B</i>	0,7550 (SE±0,092)	1,2820 (SE±0,3002)	p=0,014*	1,3340 (SE±0,3378)	p= 0,019*

Ctrl:controles; DAtt: pacientes com DA medicados e não medicados; DAmed: pacientes com DA medicados.

3 - Estudo de Proteômica de plaquetas

3.1 - Padronização da técnica de extração de proteínas de plaquetas

A centrifugação das amostras de plaquetas e a posterior recuperação do precipitado como efetuado no primeiro teste de extração de proteínas, descrito no item III- Material e Métodos, subitem 4.1, gerou amostras com quantidade insuficiente para a realização da Eletroforese Bidimensional. O mesmo resultado foi obtido com o protocolo de utilização de colunas de retenção de proteínas para a troca de tampão e recuperação das proteínas de plaquetas. Houve perda de proteína em ambos os testes. A massa média obtida para cada amostra submetida aos dois primeiros protocolos foi de 150 µg.

Para a realização da Eletroforese Bidimensional é necessário um *pool* de proteínas com massa mínima de 500 µg para cada gel de cada condição. Adicionalmente, para efeitos de comparação, é necessário fazer os géis de uma dada condição em triplicata. Assim sendo, se essas amostras fossem usadas para a realização de gel 2D, seriam necessárias pelo menos dez amostras de cada condição (DA e controles) para a viabilidade das triplicatas. Tal número de amostras foi considerado excessivo para a realização de tais experimentos e portanto, optou-se por testar mais um protocolo de extração de proteínas e também verificar em quais passos a perda protéica estava ocorrendo.

Optou-se, então, pela precipitação com Ácido Tri-cloroacético do soluto sobrenadante obtido após a centrifugação das plaquetas, fazendo-se posteriormente a lavagem com acetona e a solubilização do precipitado final com tampão de desnaturação, como descrito anteriormente. A amostra foi quantificada pelo método de Bradford e surpreendentemente apresentou massa maior do que o precipitado inicialmente coletado (aproximadamente 430 µg do sobrenadante x 90 µg do precipitado) (Figura 22). No segundo protocolo, entretanto, não foi possível verificar em qual passo a perda de proteínas estava ocorrendo.

Figura 22. Eletroforese em Gel SDS-PAGE 10% corado com Comassie R 0,1%. M para padrão molecular. Amostras 1 e 2 foram obtidas após as centrifugações e troca de tampão com a utilização dos filtros Microcon 3kda (Millipore, MA, USA). Estas amostras apresentaram baixa concentração protéica quando quantificadas pelo método de Bradford (aproximadamente 1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Amostra 3 refere-se a amostra de proteína obtida após a precipitação com Ácido Tricloroacético e lavagem com acetona do sobrenadante contendo tampão Tris-sacarose retirado da amostra 4. As amostras 4 e 5 foram obtidas a partir do *pellet* obtido após a centrifugação das plaquetas e retirada do sobrenadante contendo tampão Tris-sacarose. Estas amostras também apresentaram baixa concentração de proteínas quando quantificadas pelo método de Bradford (aproximadamente 1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). A seta indica o peso molecular aproximado de 67 kDa, peso aproximado da albumina.

A precipitação com TCA possibilitou a recuperação de proteína, porém com uma massa considerada insuficiente, assim, partiu-se então para o terceiro e último protocolo.

Para este protocolo, foram utilizadas duas amostras de plaquetas. As amostras foram precipitadas com TCA, lavadas posteriormente com acetona e homogeneizadas por pipetagem com tampão de desnaturação ao final do procedimento e finalmente congeladas. A dosagem por Bradford evidenciou uma quantidade escassa de proteínas (2 e 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteínas, aproximadamente). Acredita-se que este problema foi resultado da solubilização das amostras no tampão de desnaturação, e, no teste com as amostras seguintes, as amostras foram solubilizadas no tampão de desnaturação com a ajuda de um sonificador de haste. A quantificação por Bradford revelou então um aumento seis vezes na concentração obtida. A concentração média das proteínas extraídas estava em torno de 13 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Figura 23).

Figura 23. Eletroforese em Gel SDS-PAGE 10% corado com Comassie R 0,1%. As amostras 1-11 foram obtidas pela precipitação das plaquetas com TCA 13%, lavadas com Acetona P.A. e sonicadas para se obter uma homogeneização melhor. A quantificação por Bradford revelou uma grande quantidade de proteína (aproximadamente 13,00 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). As amostras 12 e 13 também foram precipitadas de acordo com o método anterior, porém foram homogeneizadas por pipetagem. O valor de sua concentração ficou abaixo do esperado (aproximadamente 2 e 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). M para padrão molecular. A seta indica o peso molecular aproximado de 67 kDa, peso aproximado da albumina.

Sendo assim, fez-se um *pool* de cinco amostras controles e cinco amostras de pacientes portadores de doença de Alzheimer para dar início à padronização da Eletroforese Bidimensional.

3.2 - Padronização da técnica de Eletroforese Bidimensional

Neste primeiro teste realizado, optou-se por utilizar os parâmetros de corrida eletroforética orientados pela Amersham GE Biosciences, fabricante dos equipamentos utilizados para tal. De acordo com o perfil do gel após as duas corridas, a de separação de proteínas por pH (Foco Isoelétrico) e a de separação de proteínas por peso (SDS-PAGE), as alterações necessárias para se obter um gel com *spots* nítidos seriam tomadas.

O gel não apresentou arrastes verticais ou horizontais, indicando que a extração de proteínas não gerou alterações em suas estruturas e que o acúmulo de voltagem na Focalização Isoelétrica e na corrida de separação de peso está ideal (Figura 24).

Figura 24. gel SDS-PAGE 12,5% obtido após a padronização da técnica de Eletroforese Bidimensional corado com Comassie Blue Coloidal G-250 0,12% (v/v) (Sigma- Aldrich, MO, USA), evidenciando o perfil de proteínas de plaquetas em pH 3-10. O perfil foi obtido com 500 µg de proteínas. O círculo vermelho evidencia a proteína albumina.

3.3 – Eletroforese Bidimensional de proteínas de Plaquetas

Tendo já padronizado a técnica, o próximo passo foi constituir os *pools* de proteínas de cada grupo e para cada gênero. O *pool* de amostras de proteínas para o gênero masculino utilizado para a padronização da técnica de Eletroforese Bidimensional foi o mesmo utilizado para a realização dos géis representativos do perfil protéico de plaquetas (descrito no item III- Material e Métodos, subitem 4.1, terceiro protocolo). Fez-se, então, a extração de proteínas e seleção das amostras para a constituição dos *pools* para o gênero feminino. Assim, os *pools* ficaram assim constituídos: 100 µg de proteína proveniente de cada indivíduo e 5 indivíduos por grupo (Da e Controles), gerando e a constituição dos *pools* de 500 µg de proteína total por grupo e gênero (Tabela 11).

Ao todo, foram obtidas 7 replicatas de géis 2D de proteínas provenientes do *pool* de amostras de plaquetas de pacientes com DA masculinos e controles masculinos e 3 replicatas de géis 2D de plaquetas de pacientes com DA femininos e 3 replicatas para seus respectivos controles. Contudo, os géis obtidos passaram por uma seleção levando em consideração a reprodutibilidade dos *spots* nesses diferentes géis, eliminando aqueles de menor reprodutibilidade. Todos os géis dos grupos femininos puderam ser aproveitados, pois a reprodutibilidade dos *spots* entre os géis foi alta. Para os grupos masculinos, houve a necessidade de se eliminar três pares de géis, restando então 4 géis para cada grupo (Tabela 11). Esse procedimento é importante para a análise das imagens pelo programa *ImageMaster* vs. 7 (GE Lifesciences, USA), reduzindo erros de identificação dos *spots* e perda de informação devido a ausência de *spots* em alguns géis impossibilitando comparações.

Tabela 11. Média de idade dos indivíduos selecionados para extração de proteínas utilizadas para a formação dos *pools* analisados por gel 2D, bem como a massa de proteína de cada *pool*, a contribuição protéica de cada indivíduo na formação dos *pool* e o número de géis realizados por grupo.

	Homens		Mulheres	
	DA	Controle	DA	Controle
Indivíduos por <i>pool</i>	5	5	5	5
Massa de proteínas por gel	500 µg	500 µg	500 µg	500 µg
Massa de proteína por indivíduo	100 µg	100 µg	100 µg	100 µg
Replicatas de gel	4	4	3	3

É possível observar que tanto os géis selecionados para os indivíduos do sexo masculino quanto para os indivíduos do sexo feminino mostraram-se muito semelhantes intra e inter grupos (DA X Controles), mas com diferença entre gêneros (Figura 25 e 26). Verificando mais atentamente as regiões destacadas (Quadro I e II das Figura 25 e 26), assim como o correspondente destas regiões nos outros géis da triplicata (Figura 25 e 26) os mesmos conjuntos de proteínas são evidenciados em todos os géis selecionados. No quadro I da Figura

25, por exemplo, evidencia-se um conjunto de dois *spots* bem intensos em todos os géis (réplicas), assim como é observado em todos os géis que o quadro II da mesma figura destaca, seis *spots* bem expressos. Observa-se o mesmo fato nas regiões destacadas por quadros na Figura 26, onde os *spots* presentes no gel escolhido como sendo o de referência também estão presentes nos demais. Há também uma boa representação de outros *spots* nítidos, embora pequenos. Nota-se grande quantidade de albumina nos géis, principalmente nos grupos do gênero masculino. Este *spot* está localizado na porção superior central do gel (Figura 25 e 26).

Figura 25. Perfil proteômico na faixa de pH 3-10NL de plaquetas em duas distintas classes: “Controle” e “DA” para indivíduos do sexo masculino. Os *spots* indicados por número são aqueles que apresentaram diferença significativa de expressão ($P < 0,05$). As duas regiões (I e II) demarcadas por quadro foram destacadas abaixo e comparadas com os outros géis da quadriplicata comprovando a reprodutibilidade da técnica. O quadro I evidencia a região demarcada no gel referência para os controles masculinos e os outros três géis desse grupo que formam a quadriplicata da classe. Já o quadro II evidencia também uma região reprodutiva em todos os géis, que nesse caso foi destacada para os géis DA referência e os outros géis que formam a quadriplicata da classe.

Figura 26. Perfil proteômico na faixa de pH 3-10NL de plaquetas em duas distintas classes: “Controle” e “DA” para indivíduos do sexo feminino. Os *spots* indicados por número são aqueles que apresentaram diferença significativa de expressão ($P < 0,05$). As duas regiões (I e II) demarcadas por quadro foram destacadas abaixo e comparadas com os outros géis da triplicata comprovando a reprodutibilidade da técnica. O quadro I evidencia a região demarcada no gel referência para os controles femininos e os outros dois géis desse grupo que formam a triplicata da classe. Já o quadro II evidencia também uma região reprodutiva em todos os géis, destacada para o gel DA referência e os outros géis que formam a triplicata da classe.

3.5 - Análise computacional das imagens

O número de dados (*spots*) gerados pela produção dos géis é muito extenso, o que torna necessária a análise quantitativa das informações presentes nas imagens digitalizadas por meio de uma ferramenta robusta e confiável (Marengo *et al.*, 2005). Assim, optou-se pela análise dos dados por meio de um *software* especializado, o *ImageMaster vs. 7* (GE, USA). Este *software* é capaz de reconhecer as imagens, normalizá-las, identificar os *spots*, quantificar os *spots* por densitometria, comparar os *spots* entre diferentes classes e ainda verificar estatisticamente diferenças de expressão entre as classes.

Inicialmente o *software* detecta automaticamente os *spots* presentes em todos os géis de um projeto criado, sem, ainda, comparar as diferentes classes. Nesta fase, foi possível observar

que tanto a classe “DA” como a classe “controle” para os diferentes sexos apresentaram alta similaridade entre os géis no que diz respeito ao seu perfil proteômico geral. A Figura 27 representa a etapa de detecção automática dos *spots*, neste caso das duas classes masculinas a serem comparadas.

Figura 27. Etapa de detecção automática dos *spots* pelo software *ImageMaster* vs. 7 (GE, USA). Os *spots* detectados estão destacados em vermelho.

Visto que a detecção automática dos *spots* muitas vezes pode apresentar alguns vieses, é necessário fazer a correção e detecção manual, isto é, selecionar alguns *spots* que o programa não considerou na sua busca e retirar a seleção de marcas, manchas e artefatos do gel que foram considerados erroneamente como um possível *spot*.

Após este passo, a média de *spots* detectados na classe DA masculino foi de 142 e DA feminino foi de 210. Para a classe controle, a média de *spots* detectados foi de 184 para o sexo masculino e 230 para o sexo feminino. O gel que apresentou a melhor representatividade de *spots*, dentre aqueles que compunham as replicatas de cada grupo, foi escolhido como sendo o gel de referência e a partir deste o programa realizou a normalização da intensidade de cor e *background* dos géis, para que a comparação entre as classes (Figura 28) fosse feita de forma fidedigna e confiável.

Figura 28. Imagem do programa *ImageMaster VS. 7* (GE, USA) após a comparação (*matching*) dos géis da faixa de pH 3-10 NL das classes DA e controles para indivíduos masculinos. Este gel refere-se ao gel DA referência para o grupo e seus *spots* estão evidenciados por círculos vermelhos. Os círculos azuis referem-se às posições relativas dos *spots* do gel controle referência em relação a este.

A seguir, o programa possibilita o uso de testes estatísticos para a análise diferencial de expressão dos *spots* comparados entre os grupos. Sendo assim, foi utilizado uma dessas ferramentas estatísticas disponibilizadas, o teste *Mann-Whitney*. Todos os *spots* detectados pelo programa que apresentaram pares na outra classe puderam ser submetidos a esse teste estatístico, visando com isso encontrar o valor p , para observar se há ou não variância estatística significativa entre os *spots* pareados nestas diferentes condições. Se $p < 0,05$ há uma variância significativa, ou seja, a diferença encontrada não foi por acaso, realmente existe uma alteração na expressão desta proteína.

Os algarismos arábicos nas Figuras 29 e 30 apontam quais são esses *spots* e onde eles estão localizados no perfil proteômico.

Para evidenciar a diferença quantitativa de expressão dos *spots*, o programa gera histogramas nos quais é comparado o volume relativo deste *spot* em cada um dos géis que compõe a quadriplicata ou triplicata, além da comparação feita com os géis da outra classe. Os histogramas correspondentes aos *spots* diferencialmente expressos para o grupo masculino estão representados na Figura 29. Na parte inferior do histograma pode-se observar a qual *spot* ele está representando. Já os histogramas para o grupo feminino estão representados na Figura 30.

Figura 29. Gel demonstrativo com a localização dos 5 spots diferencialmente expressos encontrados para o *pool* de proteínas de plaquetas de indivíduos do sexo masculino “DA” e “Controles” e os histogramas da variação do volume relativo. As letras a, b, c, d, representam o volume do spot correspondente nos géis “DA” e as letras e, f, g, h nos géis “Controle”.

Figura 30. Gel demonstrativo com a localização dos 5 *spots* diferencialmente expressos encontrados para o *pool* de proteínas de plaquetas de indivíduos do sexo feminino “DA” e “Controles” e os histogramas da variação do volume relativo. As letras a, b, c representam o volume do *spot* correspondente nos géis “DA” e as letras d, e, f nos géis “Controle”.

No gráfico, as barras amarelas correspondem ao volume do *spot* naquele gel, a linha horizontal azul representa a tendência central e as linhas horizontais vermelhas os limites extremos. Sendo as letras a, b, c, d correspondente aos géis DA, para o grupo masculino, e as letras e, f,

g, h aos géis controle, pode-se evidenciar na Figura 29, pelas barras amarelas verticais dos histogramas, que os *spots* 102, 114, 144 e 148 são mais expressos nos géis da classe controle, em contrapartida o *spot* 123 é mais expresso no gel da classe DA. Para o grupo feminino, as letras correspondentes a classe DA são designadas por a, b, c enquanto que as letras correspondem a classe controle correspondem a d, e, f. Na Figura 30 é possível observar que todos os *spots* são mais expressos na classe DA.

A análise computacional permitiu selecionar os *spots* de interesse, ou seja, aqueles que revelaram diferenças significativas de expressão para duas condições distintas. Foram, então, selecionados 5 *spots* diferencialmente expressos para o grupo DA masculino e 5 *spots* para o grupo DA feminino. Tais *spots* foram, então, encaminhados à identificação por Espectrometria de Massas.

3.6 - Identificação das proteínas por MS

Os *spots* selecionados foram extraídos dos géis e submetidos individualmente a uma digestão trípica. Os peptídeos purificados foram finalmente analisados por espectrometria de massas (MS) do tipo MALDI-ToF e MALDI-Q-ToF e através do método de *peptide mass fingerprinting*, que, quando identificados, geram a identificação inequívoca de cada uma das proteínas.

Como descrito anteriormente (item III -Material e Métodos, subitem 4.4.2), nas análises realizadas de todos os *spots* por MALDI-ToF, os picos monoisotópicos dos espectros de massas foram submetidos à busca em bancos de dados (*Swiss-Prot*) por intermédio do programa *Expasy-Aldente* (www.expasy.org/tools/aldente). A tolerância de erro considerada foi de no máximo 150 ppm, objetivando manter o erro abaixo dos 100 ppm para erros de calibração externa e 25 ppm para erros de calibração interna. Além disso, no programa foram mantidas as informações padrões, ou seja, faixa de procura de pH (0 a 14), MW (0 a 200 Kda), foi definida a espécie *Homo sapiens* e foi estabelecido um mínimo de 5 *hits* de peptídeos (entre o teórico e o observado) para a proteína ser considerada *match* ou provável. A calibração externa do aparelho foi realizada utilizando o CALMIX 4700 (*Applied Biosystems*, USA) que

possui picos de massa conhecida e para a calibração interna foram utilizados eventuais picos de tripsina contidos na amostra (Castro-Dias, 2010).

Para a análise realizada no espectrômetro MALDI-Q-ToF isto é, espectrômetro que possui a capacidade de quebrar peptídeos e gerar a sequência teórica dos aminoácidos que compõem o peptídeo estudado, foram utilizadas uma tolerância de fragmento de 0,1Da, faixa de procura de pH (0 a 14), MW (0 a 200 Kda) e manteve-se a tripsina como a enzima utilizada para quebrar a proteína. O banco de dados de busca continuou sendo o *Swiss-Prot*, todavia os programas MASCOT DISTILLER (Matrix Science, USA) e ProteinLynx 2.1 (Waters, USA) foram usados como intermediários nesta busca.

Nenhuma das análises realizadas no espectrômetro de massas identificou as proteínas diferencialmente expressas nos perfis proteômicos adquiridos, pois os valores obtidos pelo match eram inferiores ao valor designado pelo algoritmo MASCOT, ou seja, os peptídeos observados não eram informativos o suficiente para predizer se a proteína selecionada pelo banco de dados era precursora desses peptídeos antes da digestão.

V – Discussão

1 - Busca de Genes na Literatura e Reprodutibilidade

As ferramentas de análise em larga escala da expressão de genes como microarray, SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*), MPSS (*Massively Parallel Signature Sequencing*), etc, ou proteômica têm se mostrado como ferramentas importantes na identificação de biomarcadores em doenças complexas como as neurodegenerativas (Ginsberg *et al.*, 2000; Blalock *et al.*, 2003, 2004; Melov e Hubbard, 2004; Mirnics e Pevsner, 2004; Xu *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2010), devido à possibilidade de se acessar simultaneamente a atividade de milhares de genes ou proteínas, e assim, diversas vias e processos metabólicos.

A análise por *microarray* ainda é dispendiosa e gera uma quantidade vasta de dados, que são, na maior parte das vezes, subaproveitados (Blalock, 2005). Juntamente com a proliferação rápida de artigos de *microarray* publicados, estão os estudos que se dispuseram a compará-los. Assim sendo, os crescentes números de estudos de *microarray* são aproveitados de duas formas: re-análise dos dados primários (*raw data*) de diversos estudos, o que inclui também refazer a estatística aplicada; ou análise comparativa dos resultados publicados nos estudos, a partir das listas gênicas dispostas nas publicações (revisto em Cahan *et al.*, 2007) e subsequente validação dos genes-candidatos por meio de técnicas mais sensíveis ou em número maior de amostras.

Analisar dados primários, apesar de apresentar um coeficiente maior de reprodutibilidade dos resultados por eximir das comparações as diferentes formas de análise que cada estudo utiliza não é, na prática, tão simples quanto se imagina. Apenas uma pequena parte dos dados brutos está disposta em bancos de dados públicos, como o *Gene Expression Omnibus* (GEO), pertencente ao *NCBI* (National Center for Biotechnology Information - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). E, mesmo esta pequena parte é dificilmente acessível por mecanismos de busca (Larsson & Sandberg, 2006). Por fim, cada plataforma apresenta longas

listas de genes com nomenclaturas diferentes, o que despende muito tempo para correção e o resgate da sigla oficial de acordo com o *HUGO Gene Nomenclature Committee* (www.genenames.org).

Por outro lado, as análises de dados já processados incluem possíveis diferenças nos pontos de corte gerados pelos métodos estatísticos diversos aplicados em cada trabalho, o que gera uma diminuição no grau de reprodutibilidade dos estudos. Entretanto, métodos estatísticos aplicados de forma rigorosa e criteriosa podem revelar listas com sobreposições robustas, até mesmo entre espécies diferentes como demonstrado em uma meta-análise de 2005 (Newman and Weiner, 2005). Este estudo avaliou, em um banco de dados construído para a comparação de listas de genes expressos, 39 listas gênicas provenientes de estudos de envelhecimento cerebral e concluiu que mesmo entre espécies diferentes de mamíferos como *Macaco rhesus*, camundongo e humanos, existem sobreposições de diversos genes que podem estar associados ao envelhecimento. Ademais, a análise cruzada de dados de diversos estudos aumenta a chance de não se replicar falsos positivos (revisto em Cahan *et al.*, 2007).

Em nosso trabalho, selecionamos 14 estudos de expressão diferencial de genes pela técnica de *microarray* entre os anos de 2001 a 2007 para a doença de Alzheimer. Optou-se, neste caso pela análise dos dados já processados dispostos nos artigos. É importante ressaltar que 12 dos 14 trabalhos selecionados para este estudo analisaram o perfil de expressão gênica diferencial em tecido cerebral, mas foi possível observar que das duas publicações cujas análises de perfil de expressão gênica na DA foram conduzidas a partir de material coletado de linfócitos, uma apresentou genes com expressão diferencial coincidentes com as publicações que analisaram tecido cerebral, evidenciadas no aparecimento dos mesmos genes com mesmo perfil de expressão.

Sete dos 14 estudos utilizaram plataformas comerciais da Affymetrix, sendo que um grupo de 3 artigos (Dunckley *et al.*, 2006; Katsel *et al.*, 2007, Xu *et al.*, 2007) e outro de 2 (Colangelo *et al.*, 2002; Parachikova *et al.*, 2007) utilizaram o mesmo subtipo comercial, o U133A e U95A, respectivamente. Dentre os artigos cujas listas apresentaram genes coincidentes, somente dois (Xu *et al.*, 2007; Parachikova *et al.*, 2007) utilizaram a mesma plataforma comercial, muito

embora de subtipos diferentes, o que poderia caracterizar alguma similaridade entre diferentes plataformas. Entretanto, esta constatação não pode ser afirmada, visto que a análise das listas diferencialmente expressas nos 14 artigos, gerando um total de 593 genes, apontou apenas 8 (1,3%) genes coincidentes em mais de um estudo. A baixa reprodutibilidade entre os estudos pode ser consequência de muitos fatores a serem listados: diversidade de tecidos analisados, diferentes métodos de processamento de amostra, diferentes plataformas de *chips* de *microarray* utilizadas, diferentes versões das plataformas utilizadas, diferentes softwares de análise dos dados e diferentes métodos estatísticos aplicados (Cahan *et al.*, 2005).

De fato, muitos autores ressaltam a importância do manejo com as amostras a partir das quais o RNA será extraído, principalmente se em tecidos obtidos *post-mortem* (Soverchia *et al.*, 2005; Müller *et al.*, 2008; Crecelius *et al.*, 2008; Chandana *et al.*, 2009). Diferenças no intervalo de coleta após a morte, estocagem e alterações de pH podem comprometer ou alterar o RNA e as proteínas, podendo levar às diferenças de perfil de expressão encontrado nas diferentes publicações (Soverchia *et al.*, 2005). Chandana e colaboradores, em estudo elaborado em 2009, mediram o pH do tecido cerebral em diferentes intervalos de tempo após a morte e alertam sobre o aumento de pH em tecido cerebral em degradação, sugerindo a utilização deste fenômeno para o cálculo do intervalo *post-mortem* do material. Outros autores, adicionalmente, em estudos procurando marcadores de degradação de tecido cerebral *post-mortem*, alertam para o aumento da degradação do RNA mensageiro concomitante a essas alterações de pH como um dos fenômenos observados durante a degradação (Stan *et al.*, 2006; Chevyreva *et al.*, 2008). Segundo Larsson e Sandberg (2006), além dos parâmetros comumente utilizados para a verificação da qualidade do RNA extraído (relação A_{260nm}/A_{280nm} , relação A_{260nm}/A_{230nm} , integridade das bandas de RNA ribossomal verificada por eletroforese em gel de agarose ou outra matriz), a amostra de RNA utilizada em estudos de *microarray* cujos resultados brutos (não processados) tenham sido depositados em bancos de dados como o GEO, pode ser avaliada em relação a sua integridade pela intensidade de sinal enviado de suas regiões 3' e 5'. Um desvio de uma dessas regiões pode indicar degradação e transformar a análise de dados, podendo gerar falsos positivos (Larsson e Sandberg, 2006). Infelizmente a maioria dos estudos omite os dados sobre a qualidade do tecido coletado e nem todos os

grupos se dispõem a publicar seus resultados brutos em bancos de dados públicos (Cahan *et al.*, 2007).

Diferenças na hibridação das amostras com as sondas, hibridação cruzada e diferenças nas fluorescências das sondas (quando mais de uma sonda é utilizada no estudo) quanto a sua afinidade de hibridação com as amostras também podem gerar dados controversos, levando a uma perda da sensibilidade do estudo e a falsos positivos, caso a normalização adequada não seja realizada (Martin-Magniette *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2008).

O uso das diferentes plataformas disponíveis, bem como os softwares necessários para o processamento dos dados e os métodos estatísticos aplicados aos dados pelos diferentes estudos também são considerados fatores limitantes nas comparações e geradores da baixa reprodutibilidade aparente nas meta-análises para estudos de *microarray*. Tan e colaboradores, em 2003, testaram, para um mesmo preparo de amostras de RNA provenientes de culturas de células imortalizadas de carcinoma pancreático (PANC-1), a reprodutibilidade entre três plataformas comerciais comumente usadas, Affymetrix (U95Av.2), Agilent (*Human 1*) e Amersham (*Codelink UniSet Human I Bioarrays*). Dos 218 genes diferencialmente expressos apenas 4 (1,8%) deles eram comuns às três plataformas. Resultados similares foram obtidos por Miller e colaboradores (2004): ao analisarem uma mesma amostra de RNA extraída da substância negra de camundongos em um modelo para degeneração de neurônios dopaminérgicos por duas plataformas de arrays diferentes, uma da Amersham (*CodeLink Mouse Uniset I*) e outra da Affymetrix (U74A), os pesquisadores verificaram que somente 23 genes diferencialmente expressos (2%) eram comuns às duas plataformas em um universo de 1103 genes diferencialmente expressos.

Mesmo a utilização de uma mesma plataforma de *arrays* parece não garantir resultados reprodutíveis. Em 2002, uma edição especial da *Science* publicou dois ensaios sobre o perfil de expressão gênica de linhagens de células tronco de camundongo obtida pela técnica de *microarray* (Ramalho-Santos *et al.*, 2002; Ivanova *et al.*, 2002) e clamaram haver encontrado os genes essenciais que conferiam as características funcionais das células tronco ou “*stemness genes*”. Entretanto, a lista desses genes diferencialmente expressos publicada pelos

dois grupos (385 e 283, 668 no total), que utilizaram a mesma plataforma de análise (U74v2A, da Affymetrix) e procedimentos técnicos semelhantes, eram coincidentes para apenas 6 (0,9%) desses genes. Um ano depois, outra publicação de perfil de expressão gênica de linhagem de células tronco de camundongo obtido por *microarray* se propôs a comparar seus resultados com aqueles 2 já publicados (Fortunel *et al.*, 2003). O grupo, que também utilizou a mesma plataforma da Affymetrix que os dois estudos anteriores, contestou o chamado “*stemness genes*”, visto que os três estudos juntos (898 genes) apresentavam apenas 1 gene coincidente (0,1%) dentro deste grupo de genes essenciais estudados.

O alerta de que a reprodutibilidade dos resultados de *microarray* são sensíveis a diferentes processos foi a maior motivação para a fundação do projeto de Controle de Qualidade de *microarray*, ou *MicroArray Quality Control (MAQC) project* (MAQC Consortium, 2006). O projeto foi especificamente idealizado para identificar as fontes de variabilidade das listas de genes diferencialmente expressos apontadas anteriormente. Assim, duas amostras distintas de RNA humano denominadas de A e B, provenientes respectivamente da Stratagene, (*Stratagene Universal Human Reference RNA*) e Ambion (*Ambion Human Brain Reference RNA*) foram distribuídas para três laboratórios diferentes para serem analisadas por seis plataformas comerciais para genoma inteiro: Applied Biosystems (*Human Genome Survey Microarray v2.0*); Affymetrix (HG-U133 Plus 2.0); Agilent (*Whole Human Genome Oligo Microarray*, G4112A), GE Healthcare (*CodeLink Human Whole Genome*, 300026), Illumina (*Human-6 BeadChip*, 48K v1.0) e Eppendorf (*DualChip Microarray*). Cada amostra foi analisada em 5 réplicas técnicas para cada plataforma e os procedimentos de processamento da amostra, hibridação, processamento dos dados obtidos e normalização foram padronizados. Apenas as sondas cujas seqüências eram coincidentes para o mesmo gene foram consideradas para todas as plataformas. O estudo discute que cada plataforma apresentou diferenças na replicabilidade (padrão de sinal obtido pelas réplicas), sensibilidade e especificidade (hibridação cruzada), mas que 89% dos genes foram coincidentes para uma mesma amostra e mesma plataforma e 74% foram coincidentes para uma mesma amostra entre as diferentes plataformas. A explicação, segundo o MAQC, está no fato dos estudos de *microarray* utilizarem métodos muito estridentes ($p < 0,001$ e teste t) para a detecção e corte dos genes diferencialmente expressos,

enquanto que o uso do ranqueamento por *fold change* e valores de p mais abrangentes permitem resultados confiáveis e reprodutíveis (MAQC Consortium, 2006; Shi *et al.*, 2008). Apesar de ter sido bem aceita pela comunidade científica da área, tais afirmações atestadas pelo projeto MAQC foram rejeitadas e amplamente criticadas por grupos de estatísticos com atuações na área (Strauss, 2006; Klebanov *et al.*, 2007; Perkel, 2007).

Assim sendo, grupos de pesquisadores vêm afirmando que, muito embora a técnica de *microarray* seja imprescindível para a realização de perfis genômicos, deve-se ter muita cautela com os resultados obtidos. Se possível, o emprego de outras técnicas mais sensíveis e robustas para detecção de expressão, como PCR em tempo-real, deve ser utilizado, a fim de validar os dados significativos gerados pela primeira técnica (Chuaqui *et al.*, 2002; Dallas *et al.*, 2005; Provenzano e Mocellin, 2007). De acordo com Chuaqui (2002), as correlações de expressão entre *microarray* e PCR em tempo-real são altas para uma mesma amostra, ou seja, a mesma amostra utilizada em ambas as técnicas, para aqueles genes com valores baixos de p ($p < 0,001$). Mesmo assim é possível encontrar genes cuja diferença de expressão mostrou correlação contrária em ambas as técnicas (Wang *et al.*, 2006; Mitchell *et al.*, 2009). Hibridação cruzada e problemas com a filtragem e normalização do sinal emitido pelas sondas podem ser a explicação para os falsos positivos (Chuaqui *et al.*, 2002).

2 – Estudos de expressão gênica de leucócitos

2.1 – Validação dos genes selecionados por PCR em tempo-real

Os genes selecionados por este estudo para a validação por PCR em tempo-real eram provenientes de mais de um estudo diferente de *microarray* e as amostras usadas para a validação dos resultados obtidos *in silico* são de diferente daquelas originais. Para alguns genes (*CALM1*, *CIRBP* e *S100A4*), a sua expressão foi avaliada inicialmente em tecido diferente daquele escolhido no presente estudo (originalmente a análise para esses genes foi feita em tecido cerebral). A análise por PCR em tempo-real confirmou diferença significativa de expressão ($p < 0,05$) para 3 (*S100A4*, *KIF1B* e *ATP5J2*) dos 6 genes testados em RNA de leucócitos. Os genes *ATP5J2* e *KIF1B*, apesar de identificados como genes com perfil de

expressão diminuída em leucócitos de pacientes com DA nos estudos de *microarray*, apresentaram expressão aumentada neste mesmo tecido na validação por PCR em tempo-real, ou seja, apresentaram perfil de expressão oposto àquele originalmente descrito nos trabalhos selecionados. Apenas o *S100A4* apresentou perfil de expressão semelhante ao obtido nas análises por *microarray*, em estado de hiper regulação em pacientes em relação aos controles, e surpreendentemente, o único dos 3 genes cuja expressão foi avaliada apenas em tecido cerebral nos artigos publicados.

2.2 – Genes diferencialmente expressos

2.2.1 – *ATP5J2*

O gene *ATP5J2* (7q22.1) codifica a subunidade f do componente integral de membrana (F0) (Mao *et al.*, 1998), que, juntamente com mais oito subunidade (a, b, c, d, e, g, F6 e F8) formam o canal de próton do complexo ATP sintase. Em conjunto com o complexo catalítico F1, F0 auxilia na catalisação da produção de ATP utilizando um gradiente eletroquímico de prótons que cruzam a membrana interna da mitocôndria, durante a fosforilação oxidativa (Deckers-Hebestreit e Altendorf, 1996). O complexo ATP sintase também está presente na superfície de membranas celulares animais e serve como receptor para vários ligantes, participando de inúmeros processos celulares, incluindo angiogênese, metabolismo de lipídios, regulação de pH intracelular e sinalização citotóxica de células tumorais (revisto em Hong e Pedersen, 2008).

Embora exista, na literatura, a associação da expressão alterada de *ATP5J2* e outros componentes da ATP-Sintase e a Síndrome da Fadiga Cônica (Saiki *et al.*, 2008), ainda são poucas as publicações disponíveis sobre este gene, e nada se sabe sobre comprometimentos da função da ATP sintase devido à alterações na expressão de sua subunidade. Entretanto, sabe-se que disfunções na produção de ATP geram um desbalanço intracelular, que pode levar desde diminuição da produção de energia, pela diminuição de sua função, ou até aumento da produção de ATP e espécies reativas de oxigênio, podendo levar à apoptose (Matsuyama *et al.*, 1998). Em tecido cerebral de pacientes portadores de DA e demência pré-senil, por

exemplo, observou-se que proteínas do complexo ATP sintase estavam diminuídas em relação aos controles (Schagger e Ohm, 1995). Além disso, estudos em cérebros de pacientes com DA detectaram diminuição de expressão gênica da subunidade β do complexo, e acúmulo da subunidade α em neurônios em degeneração com ou sem emaranhados neurofibrilares (Kim *et al.*, 2000; Sergeant *et al.*, 2003). Já em leucócitos, sabe-se que aumento da expressão de genes de subunidades da ATP sintase está envolvida com sua ativação (Kaneko *et al.*, 2002), levando a suposição de que o aumento na atividade do complexo ATP sintase em células sanguíneas de tecido periférico pode estar envolvido com uma resposta a inflamação, por exemplo.

2.2.2 – KIF1B

O gene *KIF1B* (1p36.2) pertence a superfamília das cinesinas e codifica uma proteína motora anterógrada de transporte de mitocôndrias, mas que também parece estar envolvida na movimentação de precursores de vesículas sinápticas (Nangaku *et al.*, 1994) responsáveis pela mielinização de oligodendrócitos (Lyons *et al.*, 2009) e em células não neuronais, no transporte de lisossomos para a periferia celular (Matsushita *et al.*, 2004). A proteína KIF1B possui duas isoformas, KIF1B α e KIF1B β , e ambas possuem função motora. Entretanto, somente a isoforma KIF1B β está associada à síndrome Charcot-Marie Tooth subtipo 2A (Zhao *et al.*, 2001) devido a uma mutação em seu sítio de ligação ao ATP localizado dentro do domínio motor. Recentemente, esta proteína foi associada à Esclerose Múltipla (Aulchenko *et al.*, 2008).

Além de sua atividade motora, têm se evidenciado outros possíveis papéis de *KIF1B* no organismo. Estudos com linhagens celulares de neuroblastomas identificaram regiões cromossômicas deletadas, e entre elas, uma região no braço curto do cromossomo 1 na qual *KIF1B* está contido (Munirajan *et al.*, 2008). Neste mesmo estudo, foi observado que expressões diminuídas de *KIF1B* estavam envolvidas com estágios avançados do tumor, e camundongos nude *knock-down* por RNA de interferência para este gene apresentaram aumento da taxa de proliferação celular. Assim, sugeriu-se que a deleção ou subexpressão deste gene estivesse associada ao aumento desenfreado da proliferação celular. Tal hipótese

foi confirmada ao inserir vetores de expressão para *KIF1B* em cultura de células imortalizadas e verificar-se que a expressão aumentada deste gene gerou aumento da morte celular programada (Munirajan *et al.*, 2008). Outro trabalho, também de 2008, confirmou este achado, e verificou que KIF1B induz a apoptose pela ligação com a proteína EGLN3, em uma via independente de TP53 (Schlisio *et al.*, 2008). Assim como esta cinesina, outros membros da superfamília de proteínas motoras também já foram associados à indução de apoptose, como a proteína KIF4, que parece coordenar a apoptose de neurônios jovens de camundongos durante desenvolvimento cerebral, via PARP-1, uma proteína de manutenção da homeostase celular (Midorikawa *et al.*, 2006).

2.2.3 – S100A4

O gene *S100A4* (1q21) codifica uma proteína pertencente à família S100, um grupo de proteínas constituído por 21 membros. As proteínas S100 são pequenas (9-13kDa) e apresentam 2 motivos de ligação ao cálcio, os chamados “*EF-hand*” (Leclerc *et al.*, 2009). São proteínas de sinalização multifuncionais, e que possuem amplos papéis intra e extracelulares como crescimento de neuritos, comunicação intercelular, crescimento e divisão celular, manutenção da estrutura celular, metabolismo energético, contração, motilidade, sinalização intracelular e angiogênese (revisto em Donato, 2003; Santamaria-Kisiel *et al.*, 2006). Os genes que as codificam estão localizados em um *cluster* extenso na região 1q21, sujeita a rearranjos cromossômicos, o que levou muitos autores a associar estas proteínas à formação de tumores e metástase (Emberley *et al.*, 2004; Marenholz *et al.*, 2004; Garrett *et al.*, 2006; Heizmann *et al.*, 2002; Salama *et al.*, 2008). De fato, o gene *S100A4* foi isolado e caracterizado pela primeira vez em células de carcinoma mamário metastáticas (Ebralidze *et al.*, 1989) e desde então já foi associado a diversos tipos de tumores de mau prognóstico (revisto em Berge *et al.*, 2010). Muito embora os mecanismos pelos quais S100A4 promove a metástase ainda não estejam bem elucidados, sabe-se que sua atuação é essencial para o acontecimento de tal fenômeno. Estudos envolvendo culturas de células mamárias tumorais não metastáticas apresentaram alteração de seu perfil de expressão para um mais agressivo e proliferativo (Grigorian *et al.*, 1996), enquanto que carcinomas de pulmão metastáticos tratados com RNA *anti-sense* para

S100A4 perderam o perfil proliferativo (Takenaga *et al.*, 1997). Imagina-se que os efeitos promotores de metástase se devam ao fato da proteína por estar localizada em diferentes compartimentos celulares e apresentar uma vasta gama de ligantes, muitos ainda desconhecidos (Berge *et al.*, 2010).

Além de se expressar em tecidos tumorais, a expressão de *S100A4* também foi encontrada em tecidos e células saudáveis de humanos e ratos, como em linfócitos T, neutrófilos, folículos pilosos e outros (Oslejsková *et al.*, 2007). A proteína deste gene também foi detectada em condições de inflamação crônica em macrófagos, neutrófilos, subtipos de células T ativadas, células dendríticas e fibroblastos sinoviais (Oslejsková *et al.*, 2007; Klingelhofer *et al.*, 2007). No citoplasma, *S100A4* foi colocalizada ou co-sedimentada com proteínas do citoesqueleto, tais como Actina- F (Mandinova *et al.*, 1998), Miosina –IIA, Miosina não muscular (Li and Bresnick, 2006; Dulyaninova *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2003; Kriaievska *et al.*, 1994, 1998) e Tropomiosina não muscular (Takenaga *et al.*, 1994), explicando talvez um possível papel na manutenção da forma, motilidade celular e consequentemente invasão durante a metástase. Além disso, um trabalho de 2001 demonstrou que a transfecção de *S100A4* em linhagens celulares selvagens para mutação em *TP53* proporcionou a morte, por apoptose, dessas células, enquanto que a transfecção nas linhagens mutadas não estimulou a morte celular (Grigorian *et al.*, 2001). Assim, *S100A4* interage com p53 parecendo ter um papel na sua transativação, modulando a apoptose celular.

S100A4, assim como outras proteínas de sua família, também tem função parácrina. Os efeitos de sua liberação no ambiente extracelular são diversos: sensibilização de células tumorais ao mediador de apoptose IFN- γ (Pedersen *et al.*, 2004), estimulação de angiogênese (Ambartsumian *et al.*, 2001; Semov *et al.*, 2005), crescimento de neuritos (Novitskaya *et al.*, 2000) e mais recentemente, sinalização de inflamação via RAGE (*receptor for advanced glycation endproducts*) (Zvaifler *et al.*, 2006; Yammani *et al.*, 2006), uma proteína receptora de sinalização de inflamação crônica e aguda também envolvida na patologia da diabetes (Schmidt *et al.*, 1995); e doença de Alzheimer (Yan *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 2009). Segundo trabalho recente de Yammani (2009), a indução da inflamação em fibroblastos sinoviais parece

estar ligada à estimulação por IL-1, que por sua vez estimula a expressão de IL-7, que, então, estimula a secreção extracelular de S100A4 pela fosforilação e ativação das proteínas sinalizadoras JAK/STAT. Uma vez excretada, S100A4 liga-se ao RAGE (Yammani *et al.*, 2006) que uma vez ativado promove a ativação de quinases pró-inflamatórias, fatores de transcrição como o RAS p21, JNK, MAP quinases e o fator de transcrição pró-inflamatório NF-κB (Lander *et al.*, 1997; Hofmann *et al.*, 1999). Ademais, mesmo sem se ligar ao RAGE, S100A4 é capaz de promover a inflamação pela ativação direta de NF-κB (Pedersen *et al.*, 2004; Schmidt-Hansen *et al.*, 2004b).

Apesar de não existirem, na literatura, estudos associando *S100A4* à DA, outros membros de sua família, como *S100B*, *S100A9*, *S100A12* e *S100A7* já foram associados à patogênese desta doença. *S100B*, talvez o membro com associação mais ampla, parece apresentar expressão elevada tanto em tecido cerebral de pacientes com DA quanto em LCR (Petzold *et al.*, 2003; Shepherd *et al.*, 2006), quando comparado aos controles. Este gene está associado à ativação de astrócitos, em tecido cerebral (Sedaghat e Notopoulos, 2008) e sua proteína, quando excretada, também se liga ao RAGE, estimulando resposta inflamatória (Leclerc *et al.*, 2009). Sua proteína é detectada junto aos depósitos de placas senis, conjuntamente com citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, IL-1 e TNF (McGeer *et al.*, 2000). Camundongos transgênicos para expressão elevada de *S100B* em tecido cerebral apresentaram formação de neuritos distróficos, toxicidade neuronal e pior desempenho em atividade que necessitavam de memória espacial (Winocur *et al.*, 2001). Outros dois membros da família S100, *S100A9* e *S100A12*, também parecem estar envolvidos com a patogênese da DA, associados, quando em expressão elevada, à processos inflamatórios. Enquanto *S100A9* co-localiza-se com micróglia associadas às placas senis, *S100A12*, assim como o *S100B*, co-localiza-se com RAGE (Shepherd *et al.*, 2006). Já *S100A7*, o mais novo membro da família a ser associado à DA, apresenta expressão elevada de sua proteína tanto em LCR quanto em tecido cerebral de pacientes com DA. Entretanto, ao contrário dos demais membros, sua expressão aumentada não parece estar envolvida com resposta inflamatória devido às deposições de Aβ. Qin e colaboradores demonstraram, em estudo publicado em 2009, que a expressão exógena de *S100A7* em culturas primárias de neurônios hipocámpais de camundongos inibiam a produção

dos peptídeos A β , bem como estimulavam o aumento de expressão de genes associados ao complexo α -secretase. Assim, esse estudo indica que *S100A7*, diferentemente dos outros membros de sua família, ao invés de promover uma resposta inflamatória na DA, contribuindo para neurotoxicidade, tenta promover uma alteração na via de clivagem de APP, estimulando a ação de proteínas associadas à via não-amiloidogênica.

2.3 – Hipótese biológica: Marcadores de Inflamação e Apoptose

2.3.1 – Inflamação

A hipótese sustentada por este estudo baseia-se na inflamação crônica sabidamente presente na doença de Alzheimer (Meda *et al.*, 1999; Akiyama *et al.*, 2000). Respostas imunes inatas mediadas por micróglia e astrócitos ativados parecem acontecer em proximidade espacial e temporal com a deposição de A β e os A.G.E.s (*advanced glycation endproducts*) no cérebro (Benzing *et al.*, 1999). Estas respostas se dão pela liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6, quimiocinas, proteínas do sistema complemento e espécies reativas de oxigênio (ROS) (revisto em Meda *et al.*, 1999; McGeer e McGeer, 2003). Os A.G.E.s, por si só, também são capazes de estimular respostas inflamatórias pela sua ligação ao seu receptor, RAGE, que uma vez ativado, participa da regulação de IL-1, IL-6, TNF, NF- κ B, o segundo mensageiro Óxido Nítrico (NO) (Neumann *et al.*, 1999; Gasic-Milenkovic *et al.*, 2003; Akama e Van Eldik, 2000) e da ativação da microglia (Yan *et al.*, 1996). Monson e colaboradores (2003) detectaram grandes quantidades de células T reativas periféricas para A β em pacientes com DA. Não obstante, níveis em plasma e soro aumentados de IL-1, IL-6 e TNF também foram encontrados para pacientes com DA em relação a controles idosos (Sheng *et al.*, 1995; Licastro *et al.*, 2000; Reale *et al.*, 2004; Forlenza *et al.*, 2009). Este trabalho sugere que a sinalização das múltiplas citocinas estimula resposta imune periférica gerando a ativação dos linfócitos, principalmente os linfócitos T.

O desenvolvimento de células T gera a produção de 2 linhagens distintas, que apresentam receptores diferentes – α - β e γ - δ (revisto em Gladkevich *et al.*, 2004). Os linfócitos T α - β são subdivididos de acordo com a expressão dos receptores CD4 ou CD8. Os subtipos carreadores

de CD4 ajudam ou induzem a resposta imune (chamado de T helper ou Th), enquanto que os subtipos que carregam CD8 são predominantemente citotóxicos (German, 2002; MacDonald *et al.*, 2001). Dois grupos de células T CD4 foram identificadas; Th-1, que media funções associadas com citotoxicidade e reações inflamatórias locais e Th-2, que mediam a estimulação e proliferação de células B e produção de anticorpos (revisto em Gladkevich *et al.*, 2004). Sem estímulo, as células T são chamadas de *naïve*, e estão dispersas por todo o sistema sanguíneo. Se estas células receberem sinais da presença de proteínas antigênicas ou patógeno, elas se ativam e tornam-se Th1 ou Th-2 de acordo com seu *pool* de citocinas presentes na região intracelular. Assim, estas células liberam essas citocinas que podem ser pró-inflamatórias (IL-1, IL-6) ou antiinflamatórias (IL-4) (Matusevicius *et al.*, 1996; Yssel *et al.*, 1992 e revisto em Gladkevich *et al.*, 2004).

De acordo com a literatura disponível para *S100A4*, a hiperexpressão deste gene encontrada nas amostras de RNA de sangue periférico de pacientes com DA pode ser consequência da ativação dos linfócitos T, por sua vez estimulados pelas citocinas, como IL-1, liberadas pela ativação da micróglia e astrócitos do sistema nervoso central, em decorrência dos depósitos de A β e os A.G.E.s. Assim sendo, a produção de *S100A4* e posteriormente de sua proteína, serviria como sinalizador para o fator de transcrição pró-inflamatório NF- κ B (Pedersen *et al.*, 2004; Schmidt-Hansen *et al.*, 2004b) e o receptor RAGE (Yammani *et al.*, 2006), a fim de perpetuar e amplificar o sinal pró-inflamatório periférico. Neste sentido, *KIF1B* e *ATP5J2* estariam hiper-expressos em leucócitos da DA pela promoção da ativação e proliferação de células T e B, a fim de produzir proteínas auxiliando no transporte de mitocôndrias e produção de ATP (Lewis *et al.*, 2003).

Os achados consistentes de atividade reduzida em sistema nervoso central das vias colinérgicas na DA levaram a teoria de que a prevenção da diminuição da acetilcolina existente poderia melhorar os sintomas da doença (Calciano *et al.*, 2010). Dessa maneira, inibidores de acetilcolinesterase (ChEIs) têm sido usados no tratamento da DA na tentativa de prolongar a atividade da acetilcolina pela redução do seu metabolismo. Todavia, o uso de ChEIs no tratamento de pacientes DA interfere em sua resposta imune inflamatória. Descobriu-se que a

atividade eferente do nervo vago regula a produção de citocinas, especificamente via receptor $\alpha 7$ nicotínico e colinérgico ($\alpha 7$ nAChR) dependente de sinal, denominada de “via colinérgica antiinflamatória” (Borovikova *et al.*, 2000; Tracey *et al.*, 2001; Tracey, 2002; Blalock, 2002). Foi descoberto em 2000, por Borovikova e colaboradores, em um estudo envolvendo ratos modelo para endotoxemia e choque que estímulos elétricos no nervo vago periférico de ratos modelo para endotoxemia estimularam a produção de acetilcolina e suprimiram os níveis de TNF e das citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6 e IL-18 (Borovikova *et al.*, 2000). Em pacientes com DA, também foi observado que a expressão dessas citocinas pró-inflamatórias diminuía em leucócitos de sangue periférico quando o uso de ChEIs era iniciado (Reale *et al.*, 2004; Gambi *et al.*, 2004; Reale *et al.*, 2005; Calciano *et al.*, 2010).

No presente estudo, 17 dos 20 pacientes recrutados para o estudo de expressão gênica em leucócitos de sangue periférico faziam uso de ChEIs, como descrito na seção III de Material e Métodos, subitem 2.1. Isto levaria a crer que os resultados obtidos para os genes *S100A4*, *KIF1B* e *ATP5J2* não se encaixaria na hipótese biológica proposta, desempenhando papéis na inflamação periférica, visto que esta estaria suprimida, de acordo com a literatura. Entretanto, alguns trabalhos disponíveis na literatura, incluindo um estudo recente de nosso grupo de pesquisa, detectaram que, mesmo pacientes fazendo uso de ChEIs apresentam níveis de IL-1, IL-6 e TNF superiores aos níveis verificados em controles ou CCLs (Forlenza *et al.*, 2009). Mesmo um estudo realizado com culturas de células primárias de pacientes com DA antes (Th0) e após o tratamento (Th1) com ChEIs e controles idosos, demonstrou que apesar das citocinas pró-inflamatórias estarem em níveis mais elevados do que em controles em Th0 e apresentarem redução desses níveis em Th1, os níveis não se equipararam aos apresentados pelos controles, mantendo-se ainda superiores (Reale *et al.*, 2004). Estes dados demonstram então que mesmo durante o tratamento com ChEIs e a indução da “via colinérgica antiinflamatória”, ainda há resposta inflamatória periférica na DA detectável e superior aos controles.

2.3.2 – Apoptose

Outra hipótese que não pode ser descartada é a atuação destes três genes (*S100A4*, *KIF1B* e *ATP5J2*) na sinalização e participação na promoção da apoptose, que, assim como a proliferação, é outro evento altamente observado em leucócitos de pacientes com DA (Lombardi *et al.*, 1999), em conjunto com a alta concentração de cálcio intracelular e expressão aumentada de Fas (Sulger *et al.*, 1999; Richartz *et al.*, 2002). Esse evento é freqüente em células T cuja ativação e expansão já ocorreram em outro momento, e é iniciado pelo receptor de células T (TCR) e mediado pela interação da proteína Fas com a Fas ligante (Himer *et al.*, 2010). Neste contexto, *S100A4* poderia estar envolvido com a sinalização da morte celular pela sua ligação com TP53. Além dele, *KIF1B* também aparenta sinalizar a apoptose, por uma via independente de TP53, pela ligação com a proteína EGLN3 (Schlisio *et al.*, 2008).

Ademais, estudos indicam que a alta concentração de ATP intracelular é um fator preponderante para a realização da morte celular programada. Durante a apoptose, certo número de genes está hiper ou hipo regulado (Bjorling Poulsen *et al.*, 2003), proteínas, como as caspases, são convertidas de sua forma pró-ativa ou inativa para a forma ativa (Salvesen *et al.*, 1997), moléculas como citocromo C, endonuclease G e Smac/DIABLO sofrem translocações interorganelas (Du *et al.*, 2000) de maneira complexa e coordenada para a culminação da morte celular. A formação dos complexos de pró-caspases e ativação proteolítica das caspases 1 e 3, que gerarão a cascata de morte celular e a condensação da cromatina são alguns dos eventos que demandam energia, na forma de ATP (Kass *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1997). Portanto, não só os componentes pró-apoptóticos da mitocôndria, como o citocromo C e Fator indutor da apoptose (AIF) desempenham um papel importante na orquestração deste processo, mas também a própria mitocôndria desempenha papel fundamental, providenciando a energia necessária para esse processo. Em 2005, um estudo demonstrou esse fato; foi observado que durante a apoptose induzida em células tumorais de rato AK-5, ocorria a hiper expressão de genes e também de proteínas das subunidades do canal de próton F0-F1 do complexo ATP sintase (Singh e Khar, 2005). Assim, a hiper-

expressão observada para o gene *ATP5J2* neste estudo poderia ser consequência da necessidade de ATP para a promoção da apoptose além da proliferação.

2.4 – Potenciais biomarcadores

O objetivo deste projeto foi o de identificar possíveis marcadores periféricos para a Doença de Alzheimer. Para tal, os genes identificados como diferencialmente expressos em mais de um estudo publicado de expressão gênica pela técnica de *microarray* para a DA foram validados em cDNAs proveniente de leucócitos periféricos de pacientes com DA e controles idosos por PCR em tempo-real.

De acordo com o Grupo de Trabalho em Marcadores Moleculares e Bioquímicos para a Doença de Alzheimer, biomarcadores ideais para a DA têm de atender a alguns dos seguintes critérios: (1) detectar uma característica fundamental da neuropatologia, (2) ser validado em casos de DA confirmados posteriormente por autópsia, (3) serem precisos (capazes de distinguir DAs no início da doença e em seu curso – especificidade > 85%, e também de outras demências – especificidade > 75%), (4) detectar qualquer efeito benéfico modificante do tratamento, (5) serem confiáveis, não-invasivos, de simples performance, baixo custo, e (6) confirmados em pelo menos dois estudos independentes com resultados publicados em periódicos científicos indexados no *Journal Citation Report* (JCR) (*Consensus Report of the Working Group on Molecular and Biochemical Markers of Alzheimer Disease*, 1998).

No presente estudo foi possível detectar diferenças de expressão gênica em tecido periférico de pacientes com DA e controles idosos em genes selecionados a partir de estudos de *microarray*.

Este é um estudo preliminar, e foi o primeiro a associar, por PCR em tempo-real, a associação dos genes *S100A4*, *KIF1B* e *ATP5J2* com a doença de Alzheimer. Apesar dos resultados de expressão obtidos pelo presente estudo apresentarem explicação biológica apoiada pela literatura, os perfis de expressão dos genes confirmados como diferencialmente expressos foram diferentes dos revelados pelos estudos de *microarray*. Isto pode ser explicado, como

discutido anteriormente, pelas diferenças inerentes da técnica de *microarray*, diferentes tecidos e amostras avaliados.

No entanto, por ter sido o primeiro estudo a gerar essa associação, para que estes genes possam ser considerados potenciais biomarcadores periféricos são necessários que os dados obtidos sejam replicados em um número maior de amostras e também por técnicas diferentes, a fim de se observar se a correlação se mantém. Além disso, este estudo precisaria ser replicado por grupos diferentes, em amostras diferentes, para se ter certeza de que estes genes estão de fato alterados, e eliminar a possibilidade de correlação falsa pelo preparo da amostra, específico em cada laboratório.

3 – Estudo de Proteômica de plaquetas

Comparado aos perfis de expressão gênica, a proteômica representa um desafio técnico muito maior, devido a complexidade química do proteoma, muito mais vasta do que a dos ácidos nucleicos, e, diferentemente deles, não pode, até o momento, ser amplificado, o que significa que os métodos para a sua análise contam com quantias limitadas de proteína (Minden, 2007).

O estudo de perfil protéico de plaquetas por Eletroforese Bidimensional apresentado nesse estudo foi o primeiro desenvolvido em nosso laboratório. Dessa forma, os parâmetros de extração de proteínas, corrida eletroforética e digestão por tripsina precisaram ser padronizados. Para atingirmos tal objetivo, estabelecemos colaboração dos Profs. Drs. Francesco Langone (*in memoriam*), coordenador do Laboratório de Neurobiologia e José Camillo Novello, coordenador do Laboratório de Proteoma, ambos do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas. Tivemos acesso a todos os equipamentos necessários para extração de proteínas e Eletroforese Bidimensional, e ajuda técnica e intelectual dos alunos de pós-graduação desses laboratórios. Ambos os laboratórios têm uma vasta experiência em estudos com proteínas e Eletroforese Bidimensional (Castro-Dias *et al.*, 2010; Vieira *et al.*, 2009; Rezende *et al.*, 2009; Martins-de-Souza *et al.*, 2009).

Consideramos que a padronização tanto da extração quanto da eletroforese nas duas dimensões foi bem sucedida no que se refere ao perfil 2D obtido pelos géis. Os géis não apresentaram arraste vertical e pouco horizontal e os *spots* mostraram-se nítidos, o que significa que a Focalização Isoelétrica e em SDS-PAGE conseguiram ser padronizadas para essas amostras. Analizando-se o perfil de *spots* obtidos, pode afirmar-se que as replicatas de cada grupo de cada gênero foram muito similares, no que se refere a localização, intensidade e número de *spots* apresentados. De acordo com López (2007), todos os géis de um grupo ou classe, que são submetidos a uma mesma condição de corrida eletroforética, necessitam de uma eficiente reprodutibilidade para ser adequado estabelecer uma coerente comparação entre estes e géis de outros grupos submetidos à mesma condição de corrida. Ademais, os resultados obtidos tanto para o gênero masculino quanto para o feminino demonstram que existem diferenças no perfil protéico de plaquetas entre os grupos DA e controles, o que configura esta matriz como viável para a prospecção de biomarcadores de expressão protéica na doença de Alzheimer.

Selecionamos 5 *spots* diferencialmente expressos para o grupo DA versus controles masculino e 5 *spots* para o grupo DA versus controle feminino. Tais *spots* foram encaminhados à análise por espectrometria de massas no Laboratório CEBIME, sob direção da Dra. Adriana Paes Leme, pertencente ao Laboratório Nacional de Luz Sincrotron. Não tivemos sucesso na identificação dos *spots* selecionados.

Além disso, alguns parâmetros precisam ainda ser ajustados. O número de *spots* visível nos géis foi menor do que o esperado. Segundo a literatura, apesar de menos sensível do que a coloração por prata, a impregnação por Comassie Blue Coloidal permite a visualização de aproximadamente 2000 *spots* (Zhu *et al.*, 2003; López, 2007). Também se pode observar que entre os grupos de *pools* femininos e masculinos a quantidade de albumina difere, devido provavelmente aos passos de lavagem de plaquetas, muito manuais, gerando os padrões diferentes dessa proteína nos géis. Ainda assim, o *spot* referente a essa proteína é tão intenso em todos os grupos, que abrange outras regiões do gel, podendo inclusive mascarar a presença de outras proteínas importantes. Por fim, todos os *spots* diferencialmente expressos

encontrados para ambos os gêneros apresentaram razão volume/área muito pequena, o que denota uma baixa concentração de proteína, prejudicando a sua identificação por Espectrometria de Massas. Isto ocorreu devido à soma dos fatores: (1) pouca massa de proteína presente no spot, (2) eficiência da digestão triptica, sempre inferior a 100%, (3) formação de poucos fragmentos peptídicos, (4) que por sua vez necessitam formar uma porcentagem de cristais de boa qualidade quando da aplicação da matriz de ionização para a sua identificação após o tempo de voo. Como a quantidade de fragmentos já era restrita, a quantidade de cristais de boa qualidade a serem detectados e identificados foi insuficiente. Deste modo, em muitos casos, a própria enzima Tripsina (que também pode sofrer auto-clivagem) foi identificada ao invés da proteína de interesse.

Imagina-se que os problemas acima relatados se devam a: (1) o perfil, obtido a partir de 500 µg de proteínas, considerada quantidade recomendada pelo fabricante para a identificação dos *spots* por Espectrômetro de Massas para coloração por Comassie Blue Coloidal (GE Healthcare, 2004), não foi suficiente para uma ampla detecção de proteínas, gerando o número de *spots* reduzidos e de razão área/volume diminuta observados no gel; (2) proteínas muito abundantes, como a albumina, tiveram uma contribuição maior na composição dos *pools* de proteína por gel, e conseqüentemente outras proteínas pouco expressas apresentaram valores inferiores à sensibilidade do corante (10-100 ng de proteína/*spot*) (Poland *et al.*, 2005). Já se esperava que a albumina fosse de fato muito abundante, podendo até prejudicar a migração de proteínas menores durante algum dos passos da Eletroforese Bidimensional, assim, optou-se por utilizar a quantidade de proteína mínima recomendada para a posterior identificação no Espectrômetro de Massa, uma vez que um aumento nesse valor geraria um aumento maior na massa total da albumina e pouca alteração na massa das outras proteínas.

Há a possibilidade de se eliminar seletivamente tal proteína durante a extração das proteínas de plaqueta, a fim de tornar possível o aumento da massa de proteínas a ser utilizada no gel 2D. Tal eliminação pode ser feita através de diversas técnicas, como por colunas de afinidade de aparelhos de Cromatografia de Alta Precisão e utilização de anticorpos (Tam *et al.*, 2004). Contudo, muitos autores discutem a utilização destas técnicas de depleção de proteínas devido

a diversos fatores: as proteínas - alvos desses kits de depleção podem ser possíveis biomarcadores (Hye *et al.*, 2006); estratégias comumente empregadas são relativamente não-específicas e removem outras proteínas que poderiam ser possíveis biomarcadores – a proteína Fator Complemento H (CFH), por exemplo, é uma proteína que pode ser depletada em conjunto à albumina (Szafranski *et al.*, 2004; Zolotarjova *et al.*, 2005), e já foi identificada em plasma como diferencialmente expressa na DA (Hye *et al.*, 2006).

Em perspectiva, há a possibilidade de se testar uma dessas técnicas de depleção de albumina, a fim de comparar o perfil protéico a ser obtido com os já realizados. Desta forma pode-se verificar empiricamente se a depleção de proteínas abundantes gerará perdas de informação protéica. Um dos kits disponíveis comercialmente é o ProteoMiner (Bio-Rad, USA), e ele já está disponível em nosso laboratório. Esta metodologia apresenta um sistema de colunas que estão associadas à *beads* diversas ligadas aos peptídeos representativos qualitativamente e quantitativamente de bibliotecas de proteínas presentes em plasma e soro. As proteínas de uma amostra ligam-se aos peptídeos das *beads*, cuja quantidade específica segue a normalmente presente em plasma e soro. Aquelas proteínas que estiverem em concentração superior à concentração de peptídeos complementares na coluna serão eliminadas.

O primeiro passo foi dado para a implementação da proteômica em nosso laboratório e nossos resultados preliminares nos permitem inferir que a comparação do proteoma de plaquetas de pacientes com DA e controles idosos é viável para a identificação de possíveis biomarcadores protéicos periféricos para diagnóstico e/ou progressão da doença.

VI – Conclusões

1. Ao selecionar estudos prévios que estudaram tecido cerebral ou sangue periférico de pacientes com doença de Alzheimer identificamos genes diferencialmente expressos apresentados por 2 ou mais estudos independentes;
2. A concordância entre os estudos de *microarray* selecionados foi baixa, o que pode se dever a uma diversidade de razões como a utilização de tecidos regiões diferentes do mesmo órgão, processamentos de amostra, plataformas de *arrays* distintas, software de análise de dados e testes estatísticos aplicados;
3. De acordo com os critérios estabelecidos pelo presente estudo selecionamos 2 genes hiper-expressos (*CIRBP*, *S100A4*) e 4 hipo-expressos (*CALM1*, *ATP5J2*, *KIF1B*, *FLOT1*) em pacientes com DA;
4. Os genes selecionados tiveram a sua expressão investigada em RNA extraído a partir de sangue periférico de pacientes com DA e seus respectivos controles idosos. Foram observadas diferenças de expressão entre cDNAs de leucócitos de sangue periférico nos 2 grupos;
5. Dentre os genes analisados, três (*ATP5J2*, *S100A4* e *KIF1B*) apresentaram expressão aumentada no grupo DA em relação ao grupo controle ($p > 0,05$);
6. A diferença de perfil de expressão de *KIF1B* e *ATP5J2* para o grupo DA obtida pela técnica de PCR em tempo-real e os estudos de Microarray pode ser explicada pelas amostras de diferentes procedências e diferenças inerentes das técnicas;
7. Os genes *S100A4*, *KIF1B* e *ATP5J2* podem estar envolvidos com a resposta inflamatória e/ ou indução da apoptose em leucócitos de sangue periférico de pacientes com DA;
8. Mais estudos devem ser conduzidos para a confirmação dos genes *S100A4*, *KIF1B* e *ATP5J2* como potenciais biomarcadores periféricos para a DA. Precisamos ainda validar os achados em um número maior de casos de DA confirmados posteriormente por autópsia, determinar a especificidade em relação a outras demências ou doenças neurodegenerativas, determinar a especificidade para o estágio da doença e confirmar os achados em uma amostra independente;

9. O presente estudo não descarta os demais genes investigados (*CALM1*, *FLOT1* e *CIRBP*) como marcadores potenciais para a DA. Talvez eles não sejam marcadores periféricos adequados;
10. A padronização da técnica de Eletroforese Bidimensional foi bem sucedida;
11. Comparamos o proteoma de plaquetas de pacientes com DA e controles idosos e foram observadas diferenças de expressão entre proteínas de plaquetas de sangue periférico para os grupos 'sexo masculino' e 'feminino';
12. Selecionamos 5 *spots* diferencialmente expressos para o grupo DA versus controles masculino e 5 *spots* para o grupo DA versus controle feminino, porém não tivemos sucesso na identificação dos *spots* selecionados por espectrometria de massa;
13. Uma das dificuldades encontradas foi que grande parte da massa de proteínas que compôs os *pools* era de Albumina, proteína muito abundante do sangue, o que pode ter contribuído para a área reduzida de análise em cada gel e a não identificação dos *spots* diferencialmente expressos em cada grupo;
14. Os próximos passos serão a tentativa de depleção de proteínas abundantes, na tentativa de se eliminar parte da massa de albumina presente nos géis. Apesar de gerar perda de informação protéica, pode ser necessária nesse caso. Estamos equipando nosso laboratório com os equipamentos necessários para a análise de proteoma a fim de repetirmos os perfis 2D de nossas amostras para finalmente identificarmos os *spots* selecionados como diferencialmente expressos na DA;
15. Tanto o estudo de expressão gênica quanto o estudo de expressão protéica evidenciaram que a prospecção de potenciais biomarcadores para a doença de Alzheimer é viável em sangue periférico.

VII – Resumo

A Doença de Alzheimer (DA) é uma desordem neurodegenerativa influenciada por elementos genéticos e ambientais. O diagnóstico é baseado em parâmetros clínicos, mas sua confirmação é post-mortem, após avaliação patológica durante a autópsia. A identificação de biomarcadores baseados em tecido periférico como o sangue permitiria um diagnóstico menos invasivo e mais preciso, como também poderia servir como marcador de predisposição, conversão, progressão e resposta à tratamento. Para atingir tal objetivo, métodos de prospecção em larga escala de perfis de expressão gênica e protéica têm sido extensamente aplicados. O presente estudo se propôs a selecionar e validar potenciais candidatos a biomarcadores na DA, e também, de identificar potenciais biomarcadores pelo desenvolvimento de perfis proteômicos de plaquetas de pacientes. Dados publicados de *microarray* para DA foram comparados e genes com perfil de expressão similar em pelo menos dois estudos independentes foram selecionados. Foram identificados 4 genes de expressão aumentada em pacientes (*HLADRB1*, *HLAB*, *CIRBP*, *S100A4*) e 4 genes de expressão diminuída (*CALM1*, *ATP5J2*, *KIF1B*, *FLOT1*), que posteriormente foram submetidos a validação por PCR em tempo-real em amostras de RNA extraído a partir de leucócitos de sangue periférico de 20 pacientes e 20 controles idosos. Ao mesmo tempo, padronizamos e traçamos o perfil proteômico de *pools* de proteínas de plaquetas de pacientes do sexo feminino e masculino e seus respectivos controles idosos por Eletroforese Bidimensional (2-D). Dentre os genes analisados por meio de PCR em tempo-real, três (*ATP5J2*, *S100A4* e *KIF1B*) apresentaram expressão aumentada no grupo DA em relação ao grupo controle ($p > 0,05$). Estes genes podem estar envolvidos na resposta inflamatória periférica e indução da apoptose. A padronização do perfil proteômico por 2-DE foi bem sucedida e um conjunto de 5 proteínas diferencialmente expressas para ambos os gêneros foram obtidas, mas não foi possível a sua identificação por Espectrometria de Massas devido a massa limitada dessas proteínas em cada *spot*. Por ambas as técnicas foi possível identificar perfis diferentes de expressão gênica e protéica entre pacientes e controles idosos, demonstrando que sangue periférico é uma boa matriz de prospecção de biomarcadores de doenças neurodegenerativas.

VIII – Abstract

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder influenced by genetic and environmental elements. The diagnosis is based on clinical parameters, but its confirmation needs post-mortem pathologic evaluation at autopsy. The identification of biomarkers based on peripheral tissue would allow a less invasive and more accurate diagnosis, but could also serve as a marker of predisposition, conversion, progression and response to treatment. To achieve this goal, methods of exploring large-scale gene expression profiles and protein have been extensively applied. The present study proposed to select and validate potential candidate genes for biomarkers in AD, and also identify potential biomarkers from proteomic profiles of platelets of these patients. Published microarray data for AD were compared and genes with similar expression profile in at least two independent studies were selected. We identified four up-regulated genes (*HLADRB1*, *HLAB*, *CIRBP*, *S100A4*) and four down-regulated genes in patients (*CALM1*, *ATP5J2*, *KIF1B*, *FLOT1*), which were then submitted to validation by real time PCR in RNA samples extracted from peripheral blood leukocytes of 20 patients and 20 elderly controls. At the same time, standardized, and traced the proteomic profile of platelet proteins pools of female patients and male elders and their respective controls by two-dimensional electrophoresis (2-D). Among the genes analyzed by real time PCR three of them (*ATP5J2*, *S100A4* and *KIF1B*) showed increased expression in the AD group compared to the control group ($p > 0.05$). These genes may be involved in peripheral inflammatory response and induction of apoptosis. The standardization of proteomic profile by 2-DE has been successful and a set of five differentially expressed proteins in both genders were obtained, but could not be identified by mass spectrometry due to limited mass of these proteins in each spot. For both techniques were able to identify different patterns of gene and protein expression between patients and elderly controls, demonstrating that peripheral blood is a good prospect source of biomarkers for neurodegenerative diseases.

IX – Referências Bibliográficas

Abdullah L, Paris D, Luis C, Quadros A, Parrish J, Valdes L, Keegan AP, Mathura V, Crawford F, Mullan M. The influence of diagnosis, intra- and inter-person variability on serum and plasma Abeta levels. **Neurosci Lett**; 428 (2-3): 53-8, 2007.

Aebersold R, Goodlett D. Mass Spectrometry in Proteomics. **Chem Rev**; 101: 269-95, 2001.

Akama KT, Van Eldik LJ. Beta-amyloid stimulation of inducible nitric-oxide synthase in astrocytes is interleukin-1beta- and tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha)-dependent, and involves a TNFalpha receptor-associated factor- and NFkappaB-inducing kinase-dependent signaling mechanism. **J Biol Chem**; 275 (11): 7918-24, 2000.

Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, Finch CE, Frautschy S, Griffin WS, Hampel H, Hull M, Landreth G, Lue L, Mrak R, Mackenzie IR, McGeer PL, O'Banion MK, Pachter J, Pasinetti G, Plata-Salaman C, Rogers J, Rydel R, Shen Y, Streit W, Strommeyer R, Tooyoma I, Van Muiswinkel FL, Veerhuis R, Walker D, Webster S, Wegrzyniak B, Wenk G, Wyss-Coray T. Inflammation and Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging**; 21 (3): 383-421; 2000.

Alvarez XA, Franco A, Fernández-Novoa L, Cacabelos R. Blood levels of histamine, IL-1 beta, and TNF-alpha in patients with mild to moderate Alzheimer disease. **Mol Chem Neuropathol**; 29 (2-3): 237-52, 1996.

Alzgene Database (<http://www.alzgene.org>)

Alzheimer's Association. 2010 Alzheimer's Disease Facts and Figures. **Alzheimer's Association** 2010, 1-74.

Alzheimer's Disease International. World Alzheimer Report 2009. **Alzheimer's Disease International**. 2009; 1-96.

Alzheimer's Disease Collaborative Group. The structure of the presenilin 1 (S182) gene and identification of six novel mutations in early onset AD families. **Nat Genet**; 11 (2): 219-22, 1995.

Ambartsumian N, Klingelhöfer J, Grigorian M, Christensen C, Kriajevska M, Tulchinsky E, Georgiev G, Berezin V, Bock E, Rygaard J, Cao R, Cao Y, Lukanidin E. The metastasis-associated Mts1 (S100A4) protein could act as an angiogenic factor. **Oncogene**; 20 (34): 4685-95, 2001.

American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 4th ed. (DSM-IV). **American Psychiatric Association**; Washington, DC, 1994.

Army Individual Test Battery. Manual of Directions and Scoring. Washington, US **War Department, Adjunct General's Office**, 1944.

Aulchenko YS, Hoppenbrouwers IA, Ramagopalan SV, Broer L, Jafari N, Hillert J, Link J, Lundström W, Greiner E, Dessa Sadovnick A, Goossens D, Van Broeckhoven C, Del-Favero J, Ebers GC, Oostra BA, van Duijn CM, Hintzen RQ. Genetic variation in the KIF1B locus influences susceptibility to multiple sclerosis. **Nat Genet**; 40 (12): 1402-3, 2008

Banco de Dados de Mutações na doença de Alzheimer e demência Frontotemporal-
<http://www.molgen.ua.ac.be/ADMutations> - acessado em março de 2010.

Bartl MM, Luckenbach T, Bergner O, Ullrich O, Koch-Brandt C. Multiple receptors mediate apoJ-dependent clearance of cellular debris into nonprofessional phagocytes. **Exp Cell Res**; 271 (1): 130-41, 2001.

Benzing WC, Wujek JR, Ward EK, Shaffer D, Ashe KH, Younkin SG, Brunden KR. Evidence for glial-mediated inflammation in aged APP(SW) transgenic mice. **Neurobiol Aging**; 20 (6): 581-9, 1999.

Berge G, Mælandsmo GM. Evaluation of potential interactions between the metastasis-associated protein S100A4 and the tumor suppressor protein p53. **Amino Acids**. 2010 [Epub ahead of print]

Bergem AL, Engedal K, Kringlen E. The role of heredity in late-onset Alzheimer disease and vascular dementia. A twin study. **Arch Gen Psychiatry**; 54 (3): 264-70, 1997.

Bettens K, Brouwers N, Engelborghs S, De Deyn PP, Van Broeckhoven C, Sleegers K. SORL1 is genetically associated with increased risk for late-onset Alzheimer disease in the Belgian population. **Hum Mutat**; 29 (5): 769-70, 2008.

Bjørling-Poulsen M, Issinger OG. cDNA array analysis of alterations in gene expression in the promyelocytic leukemia cell line, HL-60, after apoptosis induction with etoposide. **Apoptosis**; 8 (4): 377-88, 2003.

Blalock EM, Chen KC, Sharrow K, Herman JP, Porter NM, Foster TC, Landfield PW. Gene microarrays in hippocampal aging: statistical profiling identifies novel processes correlated with cognitive impairment. **J Neurosci**; 23 (9): 3807-19, 2003.

Blalock EM, Chen KC, Stromberg AJ, Norris CM, Kadish I, Kraner SD, Porter NM, Landfield PW. Harnessing the power of gene microarrays for the study of brain aging and Alzheimer's disease: statistical reliability and functional correlation. **Ageing Res Rev**; 4 (4): 481-512, 2005.

Blalock EM, Geddes JW, Chen KC, Porter NM, Markesbery WR, Landfield PW. Incipient Alzheimer's disease: microarray correlation analyses reveal major transcriptional and tumor suppressor responses. **Proc Natl Acad Sci U S A**; 101 (7): 2173-8, 2004.

Blalock JE. Harnessing a neural-immune circuit to control inflammation and shock. **J Exp Med**; 195 (6): F25-8, 2002.

Blasko I, Kemmler G, Krampla W, Jungwirth S, Wichart I, Jellinger K, Tragl KH, Fischer P. Plasma amyloid beta protein 42 in non-demented persons aged 75 years: effects of concomitant medication and medial temporal lobe atrophy. **Neurobiol Aging**; 26 (8): 1135-43, 2005.

Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease. **Lancet**; 368 (9533): 387-403, 2006.

Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, Abumrad N, Eaton JW, Tracey KJ. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. **Nature**; 405 (6785): 458-62, 2000.

Bottino CMC, Almeida OP, Tamai S, Forlenza OV, Scalco MZ, Carvalho IAM. Entrevista estruturada para diagnóstico de transtornos mentais em idosos. São Paulo: PROTER, **Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP**; 1999.

Braak E, Griffing K, Arai K, Bohl J, Bratzke H, Braak H. Neuropathology of Alzheimer's disease: what is new since A. Alzheimer? **Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci**; 249 Suppl 3:14-22, 1999.

Braak H, Braak E. Diagnostic criteria for neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging**; 18 (4 Suppl): S85-8, 1997.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Analyt Biochem**; 72: 248-54, 1976.

Breitner JC, Silverman JM, Mohs RC, Davis KL. Familial aggregation in Alzheimer's disease: comparison of risk among relatives of early- and late-onset cases, and among male and female relatives in successive generations. **Neurology**; 38 (2): 207-12, 1988.

Brooks WM, Lynch PJ, Ingle CC, Hatton A, Emson PC, Faull RL, Starkey MP. Gene expression profiles of metabolic enzyme transcripts in Alzheimer's disease. **Brain Res**; 1127 (1): 127-35, 2007.

Cahan P, Ahmad AM, Burke H, Fu S, Lai Y, Florea L, Dharker N, Kobrinski T, Kale P, McCaffrey TA. List of lists-annotated (LOLA): a database for annotation and comparison of published microarray gene lists. **Gene**; 360(1):78-82, 2005.

Cahan P, Rovegno F, Mooney D, Newman JC, St Laurent G 3rd, McCaffrey TA. Meta-analysis of microarray results: challenges, opportunities, and recommendations for standardization. **Gene**; 401(1-2):12-8, 2007.

Calciano MA, Zhou W, Snyder PJ, Einstein R. Drug treatment of Alzheimer's patients leads to expression changes in peripheral blood cells. **Alzheimers Dement**; 2010 [Epub ahead of print]

Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi L, Righetti PG. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**; 25: 1327-1333, 2004.

Castro-Dias E, Vieira AS, Werneck CC, Langone F, Novello JC, Martins-de-Souza D. Proteome analysis of lumbar spinal cord from rats submitted to peripheral lesion during neonatal period. **J Neural Transm**. 2010 [Epub ahead of print]

Cattabeni F, Colciaghi F, Di Luca M. Platelets provide human tissue to unravel pathogenic mechanisms of Alzheimer disease. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**; 28 (5): 763-70, 2004.

Cedazo-Minguez A, Winblad B. Biomarkers for Alzheimer's disease and other forms of dementia: clinical needs, limitations and future aspects. **Exp Gerontol**; 45 (1): 5-14, 2010.

Chandana R, Mythri RB, Mahadevan A, Shankar SK, Srinivas Bharath MM. Biochemical analysis of protein stability in human brain collected at different post-mortem intervals. **Indian J Med Res**; 129 (2): 189-99, 2009.

Chevyreva IA, Faull RL, Green CR, Nicholson LF. Assessing RNA quality in postmortem human brain tissue. **Exp Mol Pathol**; 84 (1): 71-7, 2008.

Chuaqui RF, Bonner RF, Best CJ, Gillespie JW, Flaig MJ, Hewitt SM, Phillips JL, Krizman DB, Tangrea MA, Ahram M, Linehan WM, Knezevic V, Emmert-Buck MR. Post-analysis follow-up and validation of microarray experiments. **Nat Genet**; 32 Suppl: 509-14, 2002.

Ciaramella A, Bizzoni F, Salani F, Vanni D, Spalletta G, Sanarico N, Vendetti S, Caltagirone C, Bossù P. Increased pro-inflammatory response by dendritic cells from patients with Alzheimer's disease. **J Alzheimers Dis**; 19 (2): 559-72, 2010.

Colangelo V, Schurr J, Ball MJ, Pelaez RP, Bazan NG, Lukiw WJ. Gene expression profiling of 12633 genes in Alzheimer hippocampal CA1: transcription and neurotrophic factor down-regulation and up-regulation of apoptotic and pro-inflammatory signaling. **J Neurosci Res**; 70 (3): 462-73, 2002.

Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. **Science**; 13; 261 (5123): 921-3, 1993.

Corthals GL, Patterson SD, Aebersold R. Identification of Proteins by Mass Spectrometry. Proteome Research: 2D-PAGE and Detection Methodes; **Springer New York**, 197-231, 1999.

Cosentino M, Colombo C, Mauri M, Ferrari M, Corbetta S, Marino F, Bono G, Lecchini S. Expression of apoptosis-related proteins and of mRNA for dopaminergic receptors in peripheral blood mononuclear cells from patients with Alzheimer disease. **Alzheimer Dis Assoc Disord**; 23 (1): 88-90, 2009.

Craig-Schapiro R, Fagan AM, Holtzman DM. Biomarkers of Alzheimer's disease **Neurobiol Dis**; 35: 128–140, 2009.

Crecelius A, Götz A, Arzberger T, Fröhlich T, Arnold GJ, Ferrer I, Kretschmar HA. Assessing quantitative post-mortem changes in the gray matter of the human frontal cortex proteome by 2-D DIGE. **Proteomics**; 8 (6): 1276-91, 2008.

Cummings J. Alzheimer's disease clinical trials: where are we now? **Can J Neurol Sci**; 33 (1): 5, 2006.

Dallas PB, Gottardo NG, Firth MJ, Beesley AH, Hoffmann K, Terry PA, Freitas JR, Boag JM, Cummings AJ, Kees UR. Gene expression levels assessed by oligonucleotide microarray analysis and quantitative real-time RT-PCR -- how well do they correlate? **BMC Genomics**; 6 (1): 59, 2005.

Davatzikos C, Xu F, An Y, Fan Y, Resnick SM. Longitudinal progression of Alzheimer's-like patterns of atrophy in normal older adults: the SPARE-AD index. **Brain**; 132 (Pt 8): 2026-35, 2009.

de Paula, VJR, Guimarães, FM, Diniz BS, Forlenza OV. Alzheimer's disease: amyloid-beta, Tau protein or both? **Dementia & Neuropsychologia**; 3 (3): 188-194, 2009.

Deckers-Hebestreit G, Altendorf K. The F₀F₁-type ATP synthases of bacteria: structure and function of the F₀ complex. **Annu Rev Microbiol**; 50: 791-824, 1996.

Desikan RS, Cabral HJ, Hess CP, Dillon WP, Glastonbury CM, Weiner MW, Schmansky NJ, Greve DN, Salat DH, Buckner RL, Fischl B; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Automated MRI measures identify individuals with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. **Brain**; 132 (Pt 8): 2048-57, 2009.

Diniz BS, Nunes PV, Yassuda MS, Pereira FS, Flaks MK, Viola LF, Radanovic M, Abreu ID, Borelli DT, Gattaz WF, Forlenza OV. Mild cognitive impairment: cognitive screening or neuropsychological assessment? **Rev Bras Psiquiatr**; 30 (4): 316-21, 2008.

Donato R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. **Microsc Res Tech**; 60 (6): 540-51, 2003.

Drechsel DN, Hyman AA, Cobb MH, Kirschner MW. Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol Biol Cell*; 3: 1141-1154, 1992.

Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. **Cell**; 102 (1): 33-42, 2000.

Dulyaninova NG, Malashkevich VN, Almo SC, Bresnick AR. Regulation of myosin-IIA assembly and Mts1 binding by heavy chain phosphorylation. *Biochemistry*; 44 (18): 6867-76, 2005.

Dunckley T, Beach TG, Ramsey KE, Grover A, Mastroeni D, Walker DG, LaFleur BJ, Coon KD, Brown KM, Caselli R, Kukull W, Higdon R, McKeel D, Morris JC, Hulette C, Schmechel D, Reiman EM, Rogers J, Stephan DA. Gene expression correlates of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging**; 27 (10): 1359-71, 2006.

Duyckaerts C, Delatour B, Potier MC. Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol*; 118-36, 2009.

Ebralidze A, Tulchinsky E, Grigorian M, Afanasyeva A, Senin V, Revazova E, Lukanidin E. Isolation and characterization of a gene specifically expressed in different metastatic cells and whose deduced gene product has a high degree of homology to a Ca²⁺-binding protein family. **Genes Dev**; 3 (7): 1086-93, 1989.

Emberley ED, Murphy LC, Watson PH. S100A7 and the progression of breast cancer. **Breast Cancer Res**; 6 (4): 153-9, 2004.

Emilsson L, Saetre P, Jazin E. Alzheimer's disease: mRNA expression profiles of multiple patients show alterations of genes involved with calcium signaling. **Neurobiol Dis**; 21 (3): 618-25, 2006.

Erzigkeit H. The Development of the SKT Project; in Hindmarch I, Hippus H, Wilcock GK (eds): Dementia: Molecules, Methods and Measures. **Chichester, Wiley**, pp 101–108, 1991

Evans DA, Funkenstein HH, Albert MS, Scherr PA, Cook NR, Chown MJ, Hebert LE, Hennekens CH, Taylor JO. Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons. Higher than previously reported. **JAMA**; 10; 262 (18): 2551-6, 1989.

Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, Myers RH, Pericak-Vance MA, Risch N, van Duijn CM. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. **JAMA**; 278 (16): 1349-56, 1997.

Flaks MK, Yassuda MS, Regina AC, Cid CG, Camargo CH, Gattaz WF, Forlenza OV. The Short Test (SKT) – a transcultural test for early detection and discrimination of dementia: a preliminary study in Brazil. **Int Psychogeriatr**; 18: 121–133, 2006.

Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. 'Minimentalstate': a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. **J Psychiatr Res**; 12: 189–198, 1975.

Forlenza OV, Diniz BS, Talib LL, Mendonça VA, Ojopi EB, Gattaz WF, Teixeira AL. Increased serum IL-1 β level in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. **Dement Geriatr Cogn Disord**; 28 (6): 507-12, 2009.

Forlenza OV, Spink JM, Dayanandan R, Anderton BH, Olesen OF, Lovestone S. Muscarinic agonists reduce tau phosphorylation in non-neuronal cells via GSK-3 β inhibition and in neurons. **J Neural Transm**; 107: 1201-1212, 2000.

Fortunel NO, Otu HH, Ng HH, Chen J, Mu X, Chevassut T, Li X, Joseph M, Bailey C, Hatzfeld JA, Hatzfeld A, Usta F, Vega VB, Long PM, Libermann TA, Lim B. Comment on " 'Stemness': transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells" and "a stem cell molecular signature". **Science**; 302 (5644): 393; author reply 393, 2003.

Franceschi C, Capri M, Monti D, Giunta S, Olivieri F, Sevini F, Panourgia MP, Invidia L, Celani L, Scurti M, Cevenini E, Castellani GC, Salvioli S. Inflammaging and anti-inflammaging: a

systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. **Mech Ageing Dev.** 128 (1): 92-105, 2007.

Freeman SH, Raju S, Hyman BT, Frosch MP, Irizarry MC. Plasma Abeta levels do not reflect brain Abeta levels. **J Neuropathol Exp Neurol**; 66 (4): 264-71, 2007.

Freitag MH, Peila R, Masaki K, Petrovitch H, Ross GW, White LR, Launer LJ. Midlife pulse pressure and incidence of dementia: the Honolulu-Asia Aging Study. **Stroke**; 37 (1): 33-7, 2006.

Frisoni GB, Lorenzi M, Caroli A, Kemppainen N, Nägren K, Rinne JO. In vivo mapping of amyloid toxicity in Alzheimer disease. **Neurology**; 72 (17): 1504-11, 2009.

Fuld P. Guaranteed stimulus processing in the evaluation of memory and learning. **Cortex**; 16: 255-271, 1980.

Gambi F, Reale M, Iarlori C, Salone A, Toma L, Paladini C, De Luca G, Feliciani C, Salvatore M, Salerno RM, Theoharides TC, Conti P, Exton M, Gambi D. Alzheimer patients treated with an AchE inhibitor show higher IL-4 and lower IL-1 beta levels and expression in peripheral blood mononuclear cells. **J Clin Psychopharmacol**; 24 (3): 314-21, 2004.

Ganguli M, Dodge HH, Shen C, DeKosky ST. Mild cognitive impairment, amnesic type: an epidemiologic study. **Neurology**; 63 (1): 115-21, 2004.

Garrett SC, Varney KM, Weber DJ, Bresnick AR. S100A4, a mediator of metastasis. **J Biol Chem**; 281 (2): 677-80, 2006.

Gasic-Milenkovic J, Dukic-Stefanovic S, Deuther-Conrad W, Gärtner U, Münch G. Beta-amyloid peptide potentiates inflammatory responses induced by lipopolysaccharide, interferon -gamma and 'advanced glycation endproducts' in a murine microglia cell line. **Eur J Neurosci**; 17 (4): 813-21, 2003.

Gattaz WF, Cairns NJ, Levy R, Förstl H, Braus DF, Maras A. Decreased phospholipase A2 activity in the brain and in platelets of patients with Alzheimer's disease. **Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci**; 246 (3): 129-31, 1996.

Gatz M, Reynolds CA, Fratiglioni L, Johansson B, Mortimer JA, Berg S, Fiske A, Pedersen NL. Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. **Arch Gen Psychiatry**; 63 (2): 168-74, 2006.

German RN. T cell development and the CD4-CD8 lineage decision. **Na Rev Immunol**; 2: 309-322, 2002..

Ginsberg SD, Hemby SE, Lee VM, Eberwine JH, Trojanowski JQ. Expression profile of transcripts in Alzheimer's disease tangle-bearing CA1 neurons. **Ann Neurol**; 48 (1): 77-87, 2000.

Giunta B, Fernandez F, Nikolic WV, Obregon D, Rapo E, Town T, Tan J. Inflammaging as a prodrome to Alzheimer's disease. **J Neuroinflammation**; 5:51, 2008.

Gladkevich A, Kauffman HF, Korf J. Lymphocytes as a neural probe: potential for studying psychiatric disorders. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**; 28 (3): 559-76, 2004.

Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, Mant R, Newton P, Rooke K, Roques P, Talbot C, Pericak-Vance M, Roses A, Williamson R, Rossor M, Owen M, Hardy J. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. **Nature**; 349 (6311): 704-6, 1991.

Graff-Radford NR, Crook JE, Lucas J, Boeve BF, Knopman DS, Ivnik RJ, Smith GE, Younkin LH, Petersen RC, Younkin SG. Association of low plasma Abeta42/Abeta40 ratios with increased imminent risk for mild cognitive impairment and Alzheimer disease. **Arch. Neurol**; 64: 354-362, 2007.

Grigorian M, Ambartsumian N, Lykkesfeldt AE, Bastholm L, Elling F, Georgiev G, Lukanidin E. Effect of mts1 (S100A4) expression on the progression of human breast cancer cells. **Int J Cancer**; 67 (6): 831-41, 1996.

Grigorian M, Andresen S, Tulchinsky E, Kriajevska M, Carlberg C, Kruse C, Cohn M, Ambartsumian N, Christensen A, Selivanova G, Lukanidin E. Tumor suppressor p53 protein is a new target for the metastasis-associated Mts1/S100A4 protein: functional consequences of their interaction. **J Biol Chem**; 276 (25): 22699-708, 2001.

Hamilton M. A rating scale for depression. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**; 23:56-62, 1960.

Hempel H, Bürger K, Teipel SJ, Bokde AL, Zetterberg H, Blennow K. Core candidate neurochemical and imaging biomarkers of Alzheimer's disease. **Alzheimers Dement**; 4 (1): 38-48, 2008.

Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. **Science**; 297 (5580): 353-6, 2002.

Harold D, Abraham R, Hollingworth P, Sims R, Gerrish A, Hamshere ML, Pahwa JS, Moskvina V, Dowzell K, Williams A, Jones N, Thomas C, Stretton A, Morgan AR, Lovestone S, Powell J,

Proitsi P, Lupton MK, Brayne C, Rubinsztein DC, Gill M, Lawlor B, Lynch A, Morgan K, Brown KS, Passmore PA, Craig D, McGuinness B, Todd S, Holmes C, Mann D, Smith AD, Love S, Kehoe PG, Hardy J, Mead S, Fox N, Rossor M, Collinge J, Maier W, Jessen F, Schürmann B, van den Bussche H, Heuser I, Kornhuber J, Wiltfang J, Dichgans M, Frölich L, Hampel H, Hüll M, Rujescu D, Goate AM, Kauwe JS, Cruchaga C, Nowotny P, Morris JC, Mayo K, Sleegers K, Bettens K, Engelborghs S, De Deyn PP, Van Broeckhoven C, Livingston G, Bass NJ, Gurling H, McQuillin A, Gwilliam R, Deloukas P, Al-Chalabi A, Shaw CE, Tsolaki M, Singleton AB, Guerreiro R, Mühleisen TW, Nöthen MM, Moebus S, Jöckel KH, Klopp N, Wichmann HE, Carrasquillo MM, Pankratz VS, Yoonkin SG, Holmans PA, O'Donovan M, Owen MJ, Williams J. Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. **Nat Genet**; 41 (10): 1088-93, 2009

Harper PS. Mendelian inheritance or transmissible agent? The lesson Kuru and the Australia antigen. **J Med Genet**; 14 (6): 389-98, 1977.

Harris R. Genetics of Alzheimer's disease. **Br Med J (Clin Res Ed)**; 284 (6322): 1065-6, 1982.

Hata R, Masumura M, Akatsu H, Li F, Fujita H, Nagai Y, Yamamoto T, Okada H, Kosaka K, Sakanaka M, Sawada T. Up-regulation of calcineurin Abeta mRNA in the Alzheimer's disease brain: assessment by cDNA microarray. **Biochem Biophys Res Commun**; 284 (2): 310-6; 2001.

Hebert LE, Scherr PA, Bienias JL, Bennett DA, Evans DA. Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census. **Arch Neurol**; 60 (8): 1119-22, 2003.

Heinonen O, Soininen H, Sorvari H, Kosunen O, Paljärvi L, Koivisto E, Riekkinen PJ Loss of synaptophysin-like immunoreactivity in the hippocampal formation is an early phenomenon in Alzheimer's disease. **Sr. Neuroscience**; 64 (2): 375-84, 1995.

Heizmann CW, Fritz G, Schäfer BW. S100 proteins: structure, functions and pathology. **Front Biosci**; 7: d1356-68, 2002.

Helleman J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. **Genome Biol**; 8 (2): R19, 2007.

Hemming ML, Selkoe DJ. Amyloid β -protein is degraded by cellular angiotensin-converting enzyme (ACE) and elevated by an ACE inhibitor. **J Biol Chem**; 280: 37644-50, 2005.

Henzel WJ, Watanabe C, Stults JT. Protein identification: the origins of peptide mass fingerprinting. **J Am Soc Mass Spectr**; 14 (9): 931-942, 2003.

Herrera E Jr, Caramelli P, Silveira AS, Nitrini R. Epidemiologic survey of dementia in a community-dwelling Brazilian population. **Alzheimer Dis Assoc Disord**; 16 (2): 103-8, 2002.

Himer L, Csóka B, Selmeczy Z, Koscs B, Pócza T, Pacher P, Németh ZH, Deitch EA, Vizi ES, Cronstein BN, Haskó G. Adenosine A2A receptor activation protects CD4+ T lymphocytes against activation-induced cell death. **FASEB J**; 2010. [Epub ahead of print]

Hofmann MA, Drury S, Fu C, Qu W, Taguchi A, Lu Y, Avila C, Kambham N, Bierhaus A, Nawroth P, Neurath MF, Slaterry T, Beach D, McClary J, Nagashima M, Morser J, Stern D, Schmidt AM. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. **Cell**; 97 (7): 889-901, 1999.

Holtzman DM, Fagan AM, Mackey B, Tenkova T, Sartorius L, Paul SM, Bales K, Ashe KH, Irizarry MC, Hyman BT. Apolipoprotein E facilitates neuritic and cerebrovascular plaque formation in an Alzheimer's disease model. *Ann Neurol*; 47 (6): 739-47, 2000.

Hong S, Pedersen PL. ATP synthase and the actions of inhibitors utilized to study its roles in human health, disease, and other scientific areas. **Microbiol Mol Biol Rev**; 72 (4): 590-641, 2008.

HUGO Gene Nomenclature Committee - www.genenames.org – acessado em maio de 2010

Humphrey JH, Jaques R. The histamine and serotonin content of the platelets and polymorphonuclear leucocytes of various species. **J Physiol**; 124 (2): 305-10, 1954.

Hye A, Lynham S, Thambisetty M, Causevic M, Campbell J, Byers HL, Hooper C, Rijdsdijk F, Tabrizi SJ, Banner S, Shaw CE, Foy C, Poppe M, Archer N, Hamilton G, Powell J, Brown RG, Sham P, Ward M, Lovestone S. Proteome-based plasma biomarkers for Alzheimer's disease **Brain**; 129 (Pt 11): 3042-50, 2006.

International Database U.S. Census Bureau, 2009 - www.census.gov/ipc/www/idb - acessado em maio de 2010.

Iqbal K, Adel C, Chen S, et al. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. **Biochem Biophys Acta**; 13: 198-210, 2005.

Ivanova NB, Dimos JT, Schaniel C, Hackney JA, Moore KA, Lemischka IR. A stem cell molecular signature. **Science**; 298 (5593): 601-4, 2002.

Jack CR Jr, Lowe VJ, Selkoe DJ, Weigand SD, Kemp BJ, Shiung MM, Knopman DS, Boeve BF, Klunk WE, Mathis CA, Petersen RC. 11C PiB and structural MRI provide complementary

information in imaging of Alzheimer's disease and amnestic mild cognitive impairment. **Brain**; 131 (Pt 3): 665-80, 2008.

Jellinger KA, Janetzky B, Attems J, Kienzl E. Biomarkers for early diagnosis of Alzheimer disease: 'ALZheimer ASsociated gene'--a new blood biomarker? **J Cell Mol Med**; 12 (4): 1094-117; 2008.

Jellinger KA. Alzheimer 100--highlights in the history of Alzheimer research. **J Neural Transm**; 113 (11): 1603-23, 2006.

Jellinger KA. Neuropathological aspects of Alzheimer disease, Parkinson disease and frontotemporal dementia. **Neurodegener Dis**; 5 (3-4): 118-21, 2008.

Jorm AF, Jacomb PA. The Informant Questionnaire on Cognitive Decline in the Elderly (IQCODE): socio-demographic correlates, reliability, validity and some norms. **Psychol Med**; 19 (4): 1015-22, 1989.

Kálmán J, Kitajka K, Pákási M, Zvara A, Juhász A, Vincze G, Janka Z, Puskás LG. Gene expression profile analysis of lymphocytes from Alzheimer's patients. **Psychiatr Genet**; 15 (1): 1-6, 2005.

Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H, et al. APP processing and synaptic function. **Neuron**; 37: 925-37, 2003.

Kaneko H, Inoue R, Teramoto T, Morimoto W, Isogai K, Kasahara K, Kondo N. Detection of the genes induced in activated lymphocytes by modified differential display. **J Investig Allergol Clin Immuno**; 12 (2): 86-90, 2002.

Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Müller-Hill B. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. **Nature**; 19-25; 325 (6106): 733-6, 1987.

Kass GE, Eriksson JE, Weis M, Orrenius S, Chow SC. Chromatin condensation during apoptosis requires ATP. **Biochem J**; 318 (Pt 3): 749-52, 1996.

Katsel P, Li C, Haroutunian V. Gene expression alterations in the sphingolipid metabolism pathways during progression of dementia and Alzheimer's disease: a shift toward ceramide accumulation at the earliest recognizable stages of Alzheimer's disease? **Neurochem Res**; 32 (4-5): 845-56, 2007.

Kim HS, Park CH, Cha SH, Lee JH, Lee S, Kim Y, Rah JC, Jeong SJ, Suh YH. Carboxyl-terminal fragment of Alzheimer's APP destabilizes calcium homeostasis and renders neuronal cells vulnerable to excitotoxicity. **FASEB J**; 14 (11): 1508-17, 2000.

Kivipelto M, Helkala EL, Laakso MP, Hänninen T, Hallikainen M, Alhainen K, Soininen H, Tuomilehto J, Nissinen A. Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. **BMJ**; 322 (7300): 1447-51, 2001.

Klebanov L, Qiu X, Welle S, Yakovlev A. Statistical methods and microarray data. **Nat Biotechnol**; 25 (1): 25-6; author reply 26-7, 2007.

Klingelhöfer J, Senolt L, Baslund B, Nielsen GH, Skibshøj I, Pavelka K, Neidhart M, Gay S, Ambartsumian N, Hansen BS, Petersen J, Lukanidin E, Grigorian M. Up-regulation of metastasis-promoting S100A4 (Mts-1) in rheumatoid arthritis: putative involvement in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**; 56 (3): 779-89, 2007.

Kosaka T, Imagawa M, Seki K, Arai H, Sasaki H, Tsuji S, Asami-Odaka A, Fukushima T, Imai K, Iwatsubo T. The beta APP717 Alzheimer mutation increases the percentage of plasma amyloid-beta protein ending at A beta42(43). **Neurology**; 48 (3): 741-5, 1997.

Kramer AF, Hahn S, Cohen NJ, Banich MT, McAuley E, Harrison CR, Chason J, Vakil E, Bardell L, Boileau RA, Colcombe A. Ageing, fitness and neurocognitive function. **Nature**; 400 (6743): 418-9, 1999.

Kriajevska M, Tarabykina S, Bronstein I, Maitland N, Lomonosov M, Hansen K, Georgiev G, Lukanidin E. Metastasis-associated Mts1 (S100A4) protein modulates protein kinase C phosphorylation of the heavy chain of nonmuscle myosin. **J Biol Chem**; 273 (16): 9852-6, 1998.

Kriajevska MV, Cardenas MN, Grigorian MS, Ambartsumian NS, Georgiev GP, Lukanidin EM. Non-muscle myosin heavy chain as a possible target for protein encoded by metastasis-related mts-1 gene. **J Biol Chem**; 269 (31): 19679-82, 1994.

Laemmli, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**; 227: 680-685, 1970.

LaFerla FM, Green KN, Oddo S. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. **Nat Rev Neurosci**; 8 (7):499-509, 2007.

Lambert JC, Heath S, Even G, Campion D, Sleegers K, Hiltunen M, Combarros O, Zelenika D, Bullido MJ, Tavernier B, Letenneur L, Bettens K, Berr C, Pasquier F, Fiévet N, Barberger-Gateau P, Engelborghs S, De Deyn P, Mateo I, Franck A, Helisalmi S, Porcellini E, Hanon O;

European Alzheimer's Disease Initiative Investigators, de Pancorbo MM, Lendon C, Dufouil C, Jaillard C, Leveillard T, Alvarez V, Bosco P, Mancuso M, Panza F, Nacmias B, Bossù P, Piccardi P, Annoni G, Seripa D, Galimberti D, Hannequin D, Licastrò F, Soininen H, Ritchie K, Blanché H, Dartigues JF, Tzourio C, Gut I, Van Broeckhoven C, Alperovitch A, Lathrop M, Amouyel P. Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. **Nat Genet**; 41 (10): 1094-9, 2009.

Lander HM, Tauras JM, Ogiste JS, Hori O, Moss RA, Schmidt AM. Activation of the receptor for advanced glycation end products triggers a p21(ras)-dependent mitogen-activated protein kinase pathway regulated by oxidant stress. **J Biol Chem**; 272 (28): 17810-4, 1997.

Larson EB, Wang L, Bowen JD, McCormick WC, Teri L, Crane P, Kukull W. Exercise is associated with reduced risk for incident dementia among persons 65 years of age and older. **Ann Intern Med**; 144 (2): 73-81, 2006.

Larsson O, Sandberg R. Lack of correct data format and comparability limits future integrative microarray research. **Nature Biotechnology**; 24 (11): 1322-3, 2006.

Laurin D, Verreault R, Lindsay J, MacPherson K, Rockwood K. Physical activity and risk of cognitive impairment and dementia in elderly persons. **Arch Neurol**; 58 (3): 498-504, 2001.

Lautenschlager NT, Cupples LA, Rao VS, Auerbach SA, Becker R, Burke J, Chui H, Duara R, Foley EJ, Glatt SL, Green RC, Jones R, Karlinsky H, Kukull WA, Kurz A, Larson EB, Martelli K, Sadovnick AD, Volicer L, Waring SC, Growdon JH, Farrer LA. Risk of dementia among relatives of Alzheimer's disease patients in the MIRAGE study: What is in store for the oldest old? **Neurology**; 46 (3): 641-50, 1996.

Leclerc E, Fritz G, Vetter SW, Heizmann CW. Binding of S100 proteins to RAGE: an update. **Biochim Biophys Acta**; 1793 (6): 993-1007, 2009.

Lee JH, Cheng R, Honig LS, Vonsattel JP, Clark L, Mayeux R. Association between genetic variants in SORL1 and autopsy-confirmed Alzheimer disease. **Neurology**; 11; 70 (11): 887-9, 2008.

Lee JH, Cheng R, Schupf N, Manly J, Lantigua R, Stern Y, Rogaeva E, Wakutani Y, Farrer L, St George-Hyslop P, Mayeux R. The association between genetic variants in SORL1 and Alzheimer disease in an urban, multiethnic, community-based cohort. **Arch Neurol**; 64 (4): 501-6, 2007.

Levy-Lahad E, Wijsman EM, Nemens E, Anderson L, Goddard KA, Weber JL, Bird TD, Schellenberg GD. A Familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1. **Science**; 269 (5226): 970-3, 1995.

Lewis JB, Randol TM, Lockwood PE, Wataha JC. Effect of subtoxic concentrations of metal ions on NFkappaB activation in THP-1 human monocytes. **J Biomed Mater Res A**; 64 (2): 217-24, 2003.

Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, et al. Cytochrome C and dATP dependent formation of Apaf 1/casp 9 complex initiates an apoptotic protease cascade. **Cell**; 91: 479-489, 1997.

Li QX, Whyte S, Tanner JE, Evin G, Beyreuther K, Masters CL. Secretion of Alzheimer's disease Abeta amyloid peptide by activated human platelets. **Lab Invest**; 78 (4): 461-9, 1998.

Li ZH, Bresnick AR. The S100A4 metastasis factor regulates cellular motility via a direct interaction with myosin-IIA. **Cancer Res**; 66 (10): 5173-80, 2006.

Li ZH, Spektor A, Varlamova O, Bresnick AR. Mts1 regulates the assembly of nonmuscle myosin-IIA. **Biochemistry**; 42 (48): 14258-66, 2003.

Licastro F, Pedrini S, Caputo L, Annoni G, Davis LJ, Ferri C, Casadei V, Grimaldi LM. Increased plasma levels of interleukin-1, interleukin-6 and alpha-1-antichymotrypsin in patients with Alzheimer's disease: peripheral inflammation or signals from the brain? **J Neuroimmunol**; 103 (1): 97-102, 2000.

Lin B, Madan A, Yoon JG, Fang X, Yan X, Kim TK, Hwang D, Hood L, Foltz G. Massively parallel signature sequencing and bioinformatics analysis identifies up-regulation of TGFBI and SOX4 in human glioblastoma. **PLoS One**; 5 (4): e10210, 2010.

Lombardi VR, García M, Rey L, Cacabelos R. Characterization of cytokine production, screening of lymphocyte subset patterns and in vitro apoptosis in healthy and Alzheimer's Disease (AD) individuals. **J Neuroimmunol**; 97 (1-2): 163-71, 1999.

López JL. Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**; 849 (1-2): 190-202, 2007.

Lovestone S, Francis P, Kloszewska I, Mecocci P, Simmons A, Soininen H, Spenger C, Tsolaki M, Vellas B, Wahlund LO, Ward M; AddNeuroMed Consortium. AddNeuroMed--the European collaboration for the discovery of novel biomarkers for Alzheimer's disease. **Ann N Y Acad Sci**; 1180: 36-46, 2009.

Lu R, Lee GC, Shultz M, Dardick C, Jung K, Phetsom J, Jia Y, Rice RH, Goldberg Z, Schnable PS, Ronald P, Rocke DM. **BMC Bioinformatics**; 9: 314, 2008.

Luchsinger JA, Tang MX, Mayeux R. Glycemic load and risk of Alzheimer's disease. **J Nutr Health Aging**; 11 (3): 238-41, 2007.

Lyons DA, Naylor SG, Scholze A, Talbot WS. Kif1b is essential for mRNA localization in oligodendrocytes and development of myelinated axons. **Nat Genet**; 41 (7): 854-8, 2009.

MacDonald HR, Radtke F, Wilson A. T cell fate specification and ah/gly lineage commitment. **Curr Opin Immunol**; 13: 219– 224, 2001.

Maes OC, Xu S, Yu B, Chertkow HM, Wang E, Schipper HM. Transcriptional profiling of Alzheimer blood mononuclear cells by microarray. **Neurobiol Aging**; 28 (12):1795-809, 2007.

Mandinova A, Atar D, Schäfer BW, Spiess M, Aebi U, Heizmann CW. Distinct subcellular localization of calcium binding S100 proteins in human smooth muscle cells and their relocation in response to rises in intracellular calcium. **J Cell Sci**; 111 (Pt 14): 2043-54, 1998.

Mao M, Fu G, Wu JS, Zhang QH, Zhou J, Kan LX, Huang QH, He KL, Gu BW, Han ZG, Shen Y, Gu J, Yu YP, Xu SH, Wang YX, Chen SJ, Chen Z. Identification of genes expressed in human CD34(+) hematopoietic stem/progenitor cells by expressed sequence tags and efficient full-length cDNA cloning. **Proc Natl Acad Sci U S A**; 95 (14): 8175-80, 1998.

MAQC Consortium, Shi L, Reid LH, Jones WD, Shippy R, Warrington JA, Baker SC, Collins PJ, de Longueville F, Kawasaki ES, Lee KY, Luo Y, Sun YA, Willey JC, Setterquist RA, Fischer GM, Tong W, Dragan YP, Dix DJ, Frueh FW, Goodsaid FM, Herman D, Jensen RV, Johnson CD, Lobenhofer EK, Puri RK, Schrf U, Thierry-Mieg J, Wang C, Wilson M, Wolber PK, Zhang L, Amur S, Bao W, Barbacioru CC, Lucas AB, Bertholet V, Boysen C, Bromley B, Brown D, Brunner A, Canales R, Cao XM, Cebula TA, Chen JJ, Cheng J, Chu TM, Chudin E, Corson J, Corton JC, Croner LJ, Davies C, Davison TS, Delenstarr G, Deng X, Dorris D, Eklund AC, Fan XH, Fang H, Fulmer-Smentek S, Fuscoe JC, Gallagher K, Ge W, Guo L, Guo X, Hager J, Haje PK, Han J, Han T, Harbottle HC, Harris SC, Hatchwell E, Hauser CA, Hester S, Hong H, Hurban P, Jackson SA, Ji H, Knight CR, Kuo WP, LeClerc JE, Levy S, Li QZ, Liu C, Liu Y, Lombardi MJ, Ma Y, Magnuson SR, Maqsodi B, McDaniel T, Mei N, Myklebost O, Ning B, Novoradovskaya N, Orr MS, Osborn TW, Papallo A, Patterson TA, Perkins RG, Peters EH, Peterson R, Philips KL, Pine PS, Pusztai L, Qian F, Ren H, Rosen M, Rosenzweig BA, Samaha RR, Schena M, Schroth GP, Shchegrova S, Smith DD, Staedtler F, Su Z, Sun H, Szallasi Z, Tezak Z, Thierry-Mieg D, Thompson KL, Tikhonova I, Turpaz Y, Vallanat B, Van C, Walker SJ, Wang SJ, Wang Y, Wolfinger R, Wong A, Wu J, Xiao C, Xie Q, Xu J, Yang W, Zhang L, Zhong S, Zong Y, Slikker

W Jr. The MicroArray Quality Control (MAQC) project shows inter- and intraplatform reproducibility of gene expression measurements. **Nat Biotechnol**; 24 (9): 1151-61, 2006.

Marengo E, Robotti E, Antonucci F, Cecconi D, Campostrini N, Righetti PG. Numerical approaches for quantitative analysis of two-dimensional maps: a review of commercial software and home-made systems. **Proteomics**; 5 (3): 654-66, 2005.

Marenholz I, Heizmann CW. S100A16, a ubiquitously expressed EF-hand protein which is up-regulated in tumors. **Biochem Biophys Res Commun**; 313 (2): 237-44, 2004.

Martin-Magniette ML, Aubert J, Cabannes E, Daudin JJ. Evaluation of the gene-specific dye bias in cDNA microarray experiments. **Bioinformatics**; 21 (9): 1995-2000, 2005.

Martins-de-Souza D, Gattaz WF, Schmitt A, Maccarrone G, Hunyadi-Gulyás E, Eberlin MN, Souza GH, Marangoni S, Novello JC, Turck CW, Dias-Neto E. Proteomic analysis of dorsolateral prefrontal cortex indicates the involvement of cytoskeleton, oligodendrocyte, energy metabolism and new potential markers in schizophrenia. **J Psychiatr Res**; 43 (11): 978-86, 2009.

Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. **Proc Natl Acad Sci USA**; 82 (12): 4245-9, 1985.

Matsushita M, Tanaka S, Nakamura N, Inoue H, Kanazawa H. A novel kinesin-like protein, KIF1Bbeta3 is involved in the movement of lysosomes to the cell periphery in non-neuronal cells. **Traffic**; 5 (3): 140-51, 2004.

Matsuyama S, Xu Q, Velours J, Reed JC. The Mitochondrial F0F1-ATPase proton pump is required for function of the proapoptotic protein Bax in yeast and mammalian cells. **Mol Cell**; 1 (3): 327-36, 1998.

Matusevicius D, Navikas V, Palasik W, Pirskanen R, Fredrikson S, Link H. Tumor necrosis factor-alpha, lymphotoxin, interleukin (IL)-6, IL-10, IL-12, and perforin mRNA expression in mononuclear cells in response to acetylcholine receptor is augmented in myasthenia gravis. **J Neuroimmunol**; 71: 191– 198, 1996.

McGeer EG, McGeer PL. Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*; 27 (5): 741-9, 2003.

McGeer P, McGeer E, Yasojima K. Alzheimer's disease and neuroinflammation. **J Neural Transm Suppl**; 59: 53–7, 2000.

McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. **Neurology**; 34 (7): 939-44, 1984.

Meda L, Baron P, Prat E, Scarpini E, Scarlato G, Cassatella MA, Rossi F. Proinflammatory profile of cytokine production by human monocytes and murine microglia stimulated with beta-amyloid[25-35]. **J Neuroimmunol**; 93 (1-2): 45-52, 1999.

Melov S, Hubbard A. Microarrays as a tool to investigate the biology of aging: a retrospective and a look to the future. **Sci Aging Knowledge Environ**; 2004 (42): re7, 2004.

Mendes CT, Mury FB, de Sá Moreira E, Alberto FL, Forlenza OV, Dias-Neto E, Gattaz WF. Lithium reduces Gsk3b mRNA levels: implications for Alzheimer Disease. **Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci**; 259 (1): 16-22, 2009.

Mendes, CT. Lítio e expressão gênica: implicações para a doença de Alzheimer. 2008. 141 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Meng Y, Lee JH, Cheng R, St George-Hyslop P, Mayeux R, Farrer LA. Association between SORL1 and Alzheimer's disease in a genome-wide study. **Neuroreport**; 19; 18(17): 1761-4, 2007.

Mhyre TR, Loy R, Tariot PN, Profenno LA, Maguire-Zeiss KA, Zhang D, Coleman PD, Federoff HJ. Proteomic analysis of peripheral leukocytes in Alzheimer's disease patients treated with divalproex sodium. **Neurobiol Aging**; 29 (11): 1631-43, 2008.

Midorikawa R, Takei Y, Hirokawa N. KIF4 motor regulates activity-dependent neuronal survival by suppressing PARP-1 enzymatic activity. **Cell**; 125 (2): 371-83, 2006.

Miller RM, Callahan LM, Casaceli C, Chen L, Kiser GL, Chui B, Kaysser-Kranich TM, Sendera TJ, Palaniappan C, Federoff HJ. Dysregulation of gene expression in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned mouse substantia nigra. **J Neurosci**; 24 (34): 7445-54, 2004.

Minden J. Comparative proteomics and difference gel electrophoresis. **Biotechniques**; 43 (6): 739, 741, 743, 2007.

Mirnics K, Pevsner J. Progress in the use of microarray technology to study the neurobiology of disease. **Nat Neurosci**; 7 (5): 434-9, 2004.

Mitchell CJ, Nelson AE, Cowley MJ, Kaplan W, Stone G, Sutton SK, Lau A, Lee CM, Ho KK. Detection of growth hormone doping by gene expression profiling of peripheral blood. **J Clin Endocrinol Metab**; 94 (12): 4703-9, 2009.

Mohandas E, Rajmohan V, Raghunath B. Neurobiology of Alzheimer's disease. **Indian J Psychiatry**; 51 (1): 55-61, 2009.

Mohr S, Liew CC. The peripheral-blood transcriptome: new insights into disease and risk assessment. **Trends Mol Med**; 13 (10): 422-32, 2007.

Monsonogo A, Weiner HL. Immunotherapeutic approaches to Alzheimer's disease. **Science**; 302 (5646): 834-8, 2003.

Mortimer JA, Borenstein AR, Gosche KM, Snowdon DA. Very early detection of Alzheimer neuropathology and the role of brain reserve in modifying its clinical expression. **J Geriatr Psychiatry Neurol**; 18 (4): 218-23, 2005.

Mortimer JA, Borenstein AR. Tools of the epidemiologist. **Alzheimer Dis Assoc Disord**; 20 (3 Suppl 2): S35-41, 2006.

Mufson EJ, Counts SE, Ginsberg SD. Gene expression profiles of cholinergic nucleus basalis neurons in Alzheimer's disease. **Neurochem Res**; 27 (10): 1035-48, 2002.

Müller T, Jung K, Ullrich A, Schrötter A, Meyer HE, Stephan C, Egensperger R, Marcus K. Disease state, age, sex, and post-mortem time-dependent expression of proteins in AD vs. control frontal cortex brain samples. **Curr Alzheimer Res**; 5 (6): 562-71, 2008.

Munirajan AK, Ando K, Mukai A, Takahashi M, Suenaga Y, Ohira M, Koda T, Hirota T, Ozaki T, Nakagawara A. KIF1Bbeta functions as a haploinsufficient tumor suppressor gene mapped to chromosome 1p36.2 by inducing apoptotic cell death. **J Biol Chem**; 283 (36): 24426-34, 2008.

Namba Y, Tomonaga M, Kawasaki H, Otomo E, Ikeda K. Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease. **Brain Res**; 8; 541 (1): 163-6, 1991.

Nangaku M, Sato-Yoshitake R, Okada Y, Noda Y, Takemura R, Yamazaki H, Hirokawa N. KIF1B, a novel microtubule plus end-directed monomeric motor protein for transport of mitochondria. **Cell**; 79 (7): 1209-20, 1994.

NCBI -National Center for Biotechnology Information - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> - acessado em maio de 2010.

Nestor SM, Rupsingh R, Borrie M, Smith M, Accomazzi V, Wells JL, Fogarty J, Bartha R; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Ventricular enlargement as a possible measure of Alzheimer's disease progression validated using the Alzheimer's disease neuroimaging initiative database. **Brain**; 131 (Pt 9): 2443-54, 2008.

Neumann A, Schinzel R, Palm D, Riederer P, Münch G. High molecular weight hyaluronic acid inhibits advanced glycation endproduct-induced NF-kappaB activation and cytokine expression. **FEBS Lett**; 453 (3): 283-7, 1999.

Newman JC, Weiner AM. L2L: a simple tool for discovering the hidden significance in microarray expression data. **Genome Biology**; 6 (9): R81, 2005.

Nitrini R, Bottino CM, Albala C, Custodio Capuñay NS, Ketzoian C, Llibre Rodriguez JJ, Maestre GE, Ramos-Cerqueira AT, Caramelli Prevalence of dementia in Latin America: a collaborative study of population-based cohorts. **P Int Psychogeriatr**; 21 (4):622-30, 2009.

Noble W, Planel E, Zehr C, Olm V, Meyerson J, Suleman F, Gaynor K, Wang L, LaFrancois J, Feinstein B, Burns M, Krishnamurthy P, Wen Y, Bhat R, Lewis J, Dickson D, Duff K. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration in vivo. **Proc Natl Acad Sci USA**; 102: 6990-6995, 2005.

Novitskaya V, Grigorian M, Kriajevska M, Tarabykina S, Bronstein I, Berezin V, Bock E, Lukanidin E. Oligomeric forms of the metastasis-related Mts1 (S100A4) protein stimulate neuronal differentiation in cultures of rat hippocampal neurons. **J Biol Chem**; 275 (52): 41278-86; 2000.

O'Farrel PH. High resolution of two dimensional electrophoresis of proteins. **J Biol Chem**; 250 (10): 4007– 21, 1975.

Ong SE, Pandey A. An evaluation of the use of two-dimensional gel electrophoresis in proteomics. **Biomol Eng**; 18 (5): 195-205, 2001.

Organização Mundial da Saúde. Classificação de Transtornos Mentais e Comportamento do Código Internacional de Doenças 10ª Revisão – CID10. 1ª ed. São Paulo: **Artmed**, 1993, 352p.

Oslejsková L, Grigorian M, Gay S, Neidhart M, Senolt L. The metastasis associated protein S100A4: a potential novel link to inflammation and consequent aggressive behaviour of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. **Ann Rheum Dis**; 67 (11): 1499-504, 2008.

Pappin DJ, Hojrup P, Bleasby AJ. Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. **Curr Biol**; 3 (6): 327-32, 1993.

Parachikova A, Agadjanyan MG, Cribbs DH, Blurton-Jones M, Perreau V, Rogers J, Beach TG, Cotman CW. Inflammatory changes parallel the early stages of Alzheimer disease. **Neurobiol Aging**; 28 (12): 1821-33, 2007.

Pedersen KB, Andersen K, Fodstad Ø, Maelandsmo GM. Sensitization of interferon-gamma induced apoptosis in human osteosarcoma cells by extracellular S100A4. **BMC Cancer**; 4: 52, 2004.

Pericak-Vance MA, Bebout JL, Gaskell PC, Yamaoka LH, Hung W-Y, Alberts MJ, Walker AP, Bartlett RJ, Haynes CA, Welsh KA, Earl NL, Heyman A, Clark CM, Roses AD. Linkage studies in familial Alzheimer disease: evidence for chromosome 19 linkage. **Am J Hum Genet**; 48 (6): 1034-50, 1991.

Perkel JM: Six things you won't find in the MAQC. *The Scientist*; 20 (11): 68, 2007.

Perl DP. Neuropathology of Alzheimer's disease. **Mt Sinai J Med**; 77(1):32-42, 2010.

Petersen RC, Doody R, Kurz A, Mohs RC, Morris JC, Rabins PV, Ritchie K, Rossor M, Thal L, Winblad B. Current concepts in mild cognitive impairment. **Arch Neurol**; 58 (12): 1985-92, 2001.

Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E. Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. **Arch Neurol**; 56 (3): 303-8, 1999.

Petzold A, Jenkins R, Watt H, Green A, Thompson E, Keir G, et al. Cerebrospinal fluid S100B correlates with brain atrophy in Alzheimer's disease. **Neurosci Lett**; 336 (3): 167–70, 2003.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res**; 29 (9): e45, 2001.

Pike KE, Savage G, Villemagne VL, Ng S, Moss SA, Maruff P, Mathis CA, Klunk WE, Masters CL, Rowe CC. Beta-amyloid imaging and memory in non-demented individuals: evidence for preclinical Alzheimer's disease. **Brain**; 130 (Pt 11): 2837-44, 2007.

Poirier J. Apolipoprotein E in animal models of CNS injury and in Alzheimer's disease. **Trends Neurosci**; 17 (12): 525-30, 1994.

Poland J, Wandschneider S, Urbani A, Bernardini S, Federici G, Sinha P. Use of proteomics to study chemosensitivity. **Methods Mol Med**; 111: 267-81, 2005.

Provenzano M, Mocellin S. Complementary techniques: validation of gene expression data by quantitative real time PCR. **Adv Exp Med Biol**; 593: 66-73, 2007.

Qin W, Ho L, Wang J, Peskind E, Pasinetti GM. S100A7, a Novel Alzheimer's Disease Biomarker with Non-Amyloidogenic α -Secretase Activity Acts via Selective Promotion of ADAM-10. **PLoS ONE**; 4 (1): e4183, 2009.

Qiu C, Winblad B, Fratiglioni L. The age-dependent relation of blood pressure to cognitive function and dementia. **Lancet Neurol**; 4 (8): 487-99, 2005.

Querbes O, Aubry F, Pariente J, Lotterie JA, Démonet JF, Duret V, Puel M, Berry I, Fort JC, Celsis P; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Early diagnosis of Alzheimer's disease using cortical thickness: impact of cognitive reserve. **Brain**; 132 (Pt 8): 2036-47, 2009.

Querfurth HW, LaFerla, FM. Mechanisms of Disease :Alzheimer's Disease. **N Engl J Med**; 362: 329-44, 2010.

Raber J, Huang Y, Ashford JW. ApoE genotype accounts for the vast majority of AD risk and AD pathology. **Neurobiol Aging**; 25 (5): 641-50, 2004.

Rabilloud T. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. **Proteomics**. 2 (1): 3-10, 2002.

Raicher I, Shimizu MM, Takahashi DY, Nitrini R, Caramelli P. Alzheimer's disease diagnosis disclosure in Brazil: a survey of specialized physicians' current practice and attitudes. **Int Psychogeriatr**; 20 (3): 471-81, 2008.

Raiha I, Kaprio J, Koskenvuo M, Rajala T, Sourander L. Alzheimer's disease in Finnish twins. **Lancet**; 347 (9001): 573-8, 1996.

Ramalho-Santos M, Yoon S, Matsuzaki Y, Mulligan RC, Melton DA. "Stemness": transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. **Science**; 298 (5593): 597-600, 2002.

Reale M, Iarlori C, Gambi F, Feliciani C, Salone A, Toma L, DeLuca G, Salvatore M, Conti P, Gambi D. Treatment with an acetylcholinesterase inhibitor in Alzheimer patients modulates the expression and production of the pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines. **J Neuroimmunol**; 148 (1-2): 162-71, 2004.

Reale M, Iarlori C, Gambi F, Lucci I, Salvatore M, Gambi D. Acetylcholinesterase inhibitors effects on oncostatin-M, interleukin-1 beta and interleukin-6 release from lymphocytes of Alzheimer's disease patients. **Exp Geronto**; 40 (3): 165-71, 2005.

Reiber H, Peter JB. Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs. **J Neurol Sci**; 184 (2): 101-22, 2001.

Rezai-Zadeh K, Gate D, Szekely CA, Town T. Can peripheral leukocytes be used as Alzheimer's disease biomarkers? **Expert Rev Neurother**; 9 (11): 1623-33, 2009.

Rezende AC, Peroni D, Vieira AS, Rogerio F, Talaisys RL, Costa FT, Langone F, Skaper SD, Negro A. Ciliary neurotrophic factor fused to a protein transduction domain retains full neuroprotective activity in the absence of cytokine-like side effects. **J Neurochem**; 109 (6): 1680-90, 2009.

Ricciarelli R, d'Abramo C, Massone S, Marinari U, Pronzato M, Tabaton M. Microarray analysis in Alzheimer's disease and normal aging. **IUBMB Life**; 56 (6): 349-54, 2004.

Richartz E, Noda S, Schott K, Günthner A, Lewczuk P, Bartels M. Increased serum levels of CD95 in Alzheimer's disease. **Dement Geriatr Cogn Disord**; 13 (3): 178-82, 2002.

Roberts GW, Gentleman SM, Lynch A, Murray L, Landon M, Graham DI. Beta amyloid protein deposition in the brain after severe head injury: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**; 57: 419-425, 1994.

Rooit I, Brostoff J, Male D. Immunology, sixth ed., pp. 21–40. Edinburg, 2001.

Roth M, Tym E, Mountjoy CQ, Huppert FA, Hendrie H, Verma S, Goddard R. CAMDEX: a standardized instrument for the diagnosis of mental disorders in the elderly with special reference to early detection of dementia. **Br J Psychiatry**; 149: 698–709, 1986.

Saiki T, Kawai T, Morita K, Ohta M, Saito T, Rokutan K, Ban N. Identification of marker genes for differential diagnosis of chronic fatigue syndrome. **Mol Med**; 14 (9-10): 599-607, 2008.

Salama I, Malone PS, Mihaimeed F, Jones JL. A review of the S100 proteins in cancer. **Eur J Surg Oncol**; 34 (4): 357-64, 2008

Salvesen GS, Dixit VM. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. **Cell**; 91 (4): 443-6, 1997.

Sambrook J, Russell DW, Molecular Cloning: A laboratory manual. 3rd ed, **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, New York, 2001

Santamaria-Kisiel L, Rintala-Dempsey AC, Shaw GS. Calcium-dependent and -independent interactions of the S100 protein family. **Biochem J**; 396 (2): 201-14, 2006.

Schägger H, Ohm TG. Human diseases with defects in oxidative phosphorylation. 2. F1F0 ATP-synthase defects in Alzheimer disease revealed by blue native polyacrylamide gel electrophoresis. **Eur J Biochem**; 227 (3): 916-21, 1995.

Scheff SW, Sparks L, Price DA. Quantitative assessment of synaptic density in the entorhinal cortex in Alzheimer's disease. **Ann Neurol**; 34 (3): 356-61, 1993.

Schellenberg G, Bird TD, Wijsman EM, Orr HT, Anderson L, Nemens E, White JA, Bonnycastle L, Weber JL, Alonso ME, Potter H, Heston LL, Martin GM. Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. **Science**; 258 (5082): 668-71, 1992.

Scherzer CR, Offe K, Gearing M, Rees HD, Fang G, Heilman CJ, Schaller C, Bujo H, Levey AI, Lah JJ. Loss of apolipoprotein E receptor LR11 in Alzheimer disease. **Arch Neurol**; 61 (8): 1200-5, 2004.

Schlisio S, Kenchappa RS, Vredevelde LC, George RE, Stewart R, Greulich H, Shahriari K, Nguyen NV, Pigny P, Dahia PL, Pomeroy SL, Maris JM, Look AT, Meyerson M, Peeper DS, Carter BD, Kaelin WG Jr. The kinesin KIF1Bbeta acts downstream from EglN3 to induce apoptosis and is a potential 1p36 tumor suppressor. **Genes Dev**; 22 (7): 884-93, 2008.

Schlisio S, Kenchappa RS, Vredevelde LC, George RE, Stewart R, Greulich H, Shahriari K, Nguyen NV, Pigny P, Dahia PL, Pomeroy SL, Maris JM, Look AT, Meyerson M, Peeper DS, Carter BD, Kaelin WG Jr. The kinesin KIF1Bbeta acts downstream from EglN3 to induce apoptosis and is a potential 1p36 tumor suppressor. **Genes Dev**; 22 (7): 884-93, 2008.

Schmidt AM, Hori O, Chen JX, Li JF, Crandall J, Zhang J, Cao R, Yan SD, Brett J, Stern D. Advanced glycation endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice. A potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes. **J Clin Invest**; 96 (3): 1395-403, 1995.

Schmidt AM, Sahagan B, Nelson RB, Selmer J, Rothlein R, Bell JM. The role of RAGE in amyloid-beta peptide-mediated pathology in Alzheimer's disease. **Curr Opin Investig Drugs**; 10 (7): 672-80, 2009.

Schmidt-Hansen B, Ornås D, Grigorian M, Klingelhöfer J, Tulchinsky E, Lukanidin E, Ambartsumian N. Extracellular S100A4(mts1) stimulates invasive growth of mouse endothelial cells and modulates MMP-13 matrix metalloproteinase activity. **Oncogene**; 23 (32): 5487-95, 2004.

Schupf N, Patel B, Silverman W, Zigman WB, Zhong N, Tycko B, Mehta PD, Mayeux R. Elevated plasma amyloid beta-peptide 1–42 and onset of dementia in adults with Down syndrome. **Neurosci. Lett**; 301: 199–203, 2001.

Sedaghat F, Notopoulos A. S100 protein family and its application in clinical practice. **HIPPOKRATIA**; 12, 4: 198-204, 2008.

Selkoe DJ. Amyloid protein and Alzheimer's disease. **Sci Am**; 265: 68-71, 1991.

Semov A, Moreno MJ, Onichtchenko A, Abulrob A, Ball M, Ekiel I, Pietrzynski G, Stanimirovic D, Alakhov V. 41Metastasis-associated protein S100A4 induces angiogenesis through interaction with Annexin II and accelerated plasmin formation. **J Biol Chem**; 280 (21): 20833-, 2005.

Sergeant N, Wattez A, Galván-valencia M, Ghestem A, David JP, Lemoine J, Sautière PE, Dachary J, Mazat JP, Michalski JC, Velours J, Mena-López R, Delacourte A. Association of ATP synthase alpha-chain with neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. **Neuroscience**; 117 (2): 293-303, 2003.

Seshadri S, DeStefano AL, Au R, Massaro JM, Beiser AS, Kelly-Hayes M, Kase CS, D'Agostino RB Sr, Decarli C, Atwood LD, Wolf PA. Genetic correlates of brain aging on MRI and cognitive test measures: a genome-wide association and linkage analysis in the Framingham Study. **BMC Med Genet**. 19; 8 Suppl 1:S15, 2007.

Sheng JG, Mrak RE, Griffin WS. Microglial interleukin-1 alpha expression in brain regions in Alzheimer's disease: correlation with neuritic plaque distribution. **Neuropathol Appl Neurobiol**; 21 (4): 290-301, 1995.

Shepherd CE, J. Goyette J, Utter V, Rahimi F, Yang Z, Geczy CL, Halliday GM. Inflammatory S100A9 and S100A12 proteins in Alzheimer's disease. **Neurobiol of Aging**; 27: 1554–1563, 2006.

Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, Tsuda T, Mar L, Foncin J-F, Bruni AC, Montesi MP, Sorbi S, Rainero I, Pinessi L, Nee L, Chumakov I, Pollen D, Brookes A, Sanseau P, Polinsky RJ, Wasco W, Da Silva HAR, Haines JL, Pericak-Vance MA, Tanzi RE, Roses AD, Fraser PE, Rommens JM, St George-Hyslop PH. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. **Nature**; 375, 754 – 760, 1995.

Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. **Anal Chem**; 68 (5): 850-8, 1996.

Shi L, Jones WD, Jensen RV, Harris SC, Perkins RG, Goodsaid FM, Guo L, Croner LJ, Boysen C, Fang H, Qian F, Amur S, Bao W, Barbacioru CC, Bertholet V, Cao XM, Chu TM, Collins PJ, Fan XH, Frueh FW, Fuscoe JC, Guo X, Han J, Herman D, Hong H, Kawasaki ES, Li QZ, Luo Y, Ma Y, Mei N, Peterson RL, Puri RK, Shippey R, Su Z, Sun YA, Sun H, Thorn B, Turpaz Y, Wang C, Wang SJ, Warrington JA, Willey JC, Wu J, Xie Q, Zhang L, Zhang L, Zhong S, Wolfinger RD, Tong W. The balance of reproducibility, sensitivity, and specificity of lists of differentially expressed genes in microarray studies. **BMC Bioinformatics**; 9 Suppl 9: S10, 2008.

Singh S, Khar A. Differential gene expression during apoptosis induced by a serum factor: role of mitochondrial F0-F1 ATP synthase complex. **Apoptosis**; 10 (6): 1469-82, 2005.

Slegers K, Lambert JC, Bertram L, Cruts M, Amouyel P, Van Broeckhoven C. The pursuit of susceptibility genes for Alzheimer's disease: progress and prospects. **Trends Genet**; 26 (2): 84-93, 2010.

Song F, Poljak A, Smythe GA, Sachdev P. Plasma biomarkers for mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. **Brain Res Rev**; 61 (2): 69-80, 2009.

Soverchia L, Ubaldi M, Leonardi-Essmann F, Ciccocioppo R, Hardiman G. Microarrays--the challenge of preparing brain tissue samples. **Addict Biol**; 10 (1): 5-13, 2005.

Stan AD, Ghose S, Gao XM, Roberts RC, Lewis-Amezcu K, Hatanpaa KJ, Tamminga CA. Human postmortem tissue: what quality markers matter? **Brain Res**; 1123 (1): 1-11, 2006.

Stern Y. Cognitive reserve and Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord*; (3 Suppl 2): S69-74, 2006.

Stozická Z, Zilka N, Novák M. Risk and protective factors for sporadic Alzheimer's disease. **Acta Virol**; 51 (4): 205-22, 2007.

Strauss E. Arrays of hope. **Cell**; 127 (4): 657-9, 2006.

Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. **Proc Natl Acad Sci USA**; 90 (5): 1977-81, 1993.

Sulger J, Dumais-Huber C, Zerfass R, Henn FA, Aldenhoff JB. The calcium response of human T lymphocytes is decreased in aging but increased in Alzheimer's dementia. **Biol Psychiatry**; 45 (6): 737-42, 1999.

Sundelof J, Giedraitis V, Irizarry MC, Sundstrom J, Ingelsson E, Ronnema E, Arnlov J, Gunnarsson MD, Hyman BT, Basun H, Ingelsson M, Lannfelt L, Kilander L. Plasma beta amyloid and the risk of Alzheimer disease and dementia in elderly men: a prospective, population-based cohort study. **Arch.Neurol**; 65: 256–263, 2008.

Sunderland T, Hill JL, Mellow AM, Lawlor BA, Gundersheimer J, Newhouse PA, Grafman JH: Clock drawing in Alzheimer's disease. A novel measure of disease severity. **J Am Geriatr Soc**; 37: 725–729, 1989.

Szafranski C, Bailey J, Turck CJ, Nicol G, Martosella J, Zolotarjova N.Enhancing analytical access to low abundant proteins in the human plasma proteome. **PharmaGenomics**; p. 40–6, 2004.

Takada LT, Caramelli P, Radanovic M, Anghinah R, Hartmann AP, Guariglia CC, Bahia VS, Nitrini R . Prevalence of potentially reversible dementias in a dementia outpatient clinic of a tertiary university-affiliated hospital in Brazil. **R Arq Neuropsiquiatr**; 61 (4): 925-9, 2003.

Takenaga K, Nakamura Y, Sakiyama S, Hasegawa Y, Sato K, Endo H. Binding of pEL98 protein, an S100-related calcium-binding protein, to nonmuscle tropomyosin. **J Cell Biol**; 124 (5): 757-68, 1994.

Takenaga K, Nakanishi H, Wada K, Suzuki M, Matsuzaki O, Matsuura A, Endo H. Increased expression of S100A4, a metastasis-associated gene, in human colorectal adenocarcinomas. **Clin Cancer Res**; (12 Pt 1): 2309-16, 1997.

Tam SW, Pirro J, Hinerfeld D. Depletion and fractionation technologies in plasma proteomic analysis. **Expert Rev Proteomics**; 1 (4): 411-20, 2004.

Tan EK, Lee J, Chen CP, Teo YY, Zhao Y, Lee WL. SORL1 haplotypes modulate risk of Alzheimer's disease in Chinese. **Neurobiol Aging**; 30 (7): 1048-51, 2009.

Tan PK, Downey TJ, Spitznagel EL Jr, Xu P, Fu D, Dimitrov DS, Lempicki RA, Raaka BM, Cam MC. Evaluation of gene expression measurements from commercial microarray platforms. **Nucleic Acids Res**; 31 (19): 5676-84, 2003.

The Ronald and Nancy Reagan Research Institute of the Alzheimer's Association and the National Institute on Aging Working Group. Consensus report of the Working Group on: "Molecular and Biochemical Markers of Alzheimer's Disease". **Neurobiol Aging**; 19 (2):109-16, 1998.

Thiede B; Wolfgang H; Kraha A; Mattowc J; Schmid M; Schmidt F; Jungblut PR. Peptide mass Fingerprinting. **Methods**; 35: 237–247, 2005.

Tracey KJ, Czura CJ, Ivanova S. Mind over immunity. **FASEB J**; 15 (9): 1575-6, 2001.

Tracey KJ. The inflammatory reflex. **Nature**; 420 (6917): 853-9, 2002.

Trevino V, Falciani F, Barrera-Saldaña HA. DNA microarrays: a powerful genomic tool for biomedical and clinical research. **Mol Med**; 13 (9-10): 527-41, 2007.

van der Flier WM, Scheltens P. Epidemiology and risk factors of dementia. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**; 76 (Suppl 5): v2-7, 2005.

van Oijen M, Hofman A, Soares HD, Koudstaal PJ, Breteler MM. Plasma Abeta(1–40) and Abeta (1–42) and the risk of dementia: a prospective casecohortstudy. **Lancet Neurol**; 5: 655–660, 2006.

Vanderstichele H, Van Kerschave, E, Hesse C, Davidsson P, Buyse MA, Andreasen N, Minthon L, Wallin A, Blennow K, Vanmechelen E. Standardization of measurement of beta-amyloid (1–42) in cerebrospinal fluid and plasma. **Amyloid** 7: 245–258, 2000.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol**; 3 (7): RESEARCH0034.1 – 0034.11, 2002.

Vieira AS, Rezende AC, Grigoletto J, Rogério F, Velloso LA, Skaper SD, Negro A, Langone F. Ciliary neurotrophic factor infused intracerebroventricularly shows reduced catabolic effects when linked to the TAT protein transduction domain. **J Neurochem**; 110 (5): 1557-66, 2009.

Walker PR, Smith B, Liu QY, Famili AF, Valdés JJ, Liu Z, Lach B. Data mining of gene expression changes in Alzheimer brain. **Artif Intel Med**; 31 (2): 137-54, 2004.

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

Wang L, Larson EB, Bowen JD, van Belle G. Performance-based physical function and future dementia in older people. **Arch Intern Med**; 166 (10): 1115-20, 2006.

Wang Y, Barbacioru C, Hyland F, Xiao W, Hunkapiller KL, Blake J, Chan F, Gonzalez C, Zhang L, Samaha RR. Large scale real-time PCR validation on gene expression measurements from two commercial long-oligonucleotide microarrays. **BMC Genomics**; 7: 59, 2006.

Web of Science v. 4.3- <http://www.isiknowledge.com> – acessado em janeiro de 2008.

Weeraratna AT, Kalehua A, Deleon I, Bertak D, Maher G, Wade MS, Lustig A, Becker KG, Wood W 3rd, Walker DG, Beach TG, Taub DD. Alterations in immunological and neurological gene expression patterns in Alzheimer's disease tissues. **Expl Cell Res**; 313 (3): 450-61, 2007.

Wilson B, Cockburn J, Baddeley AD. Rivermead Behavioural Memory Test. **Bury St. Edmunds, Thames Valley Test Company**, 1985.

Wimo A, Winblad B, Jönsson L. An estimate of the total worldwide societal costs of dementia in 2005. **Alzheimers Dement**; 3 (2): 81-91, 2007.

Wimo A, Winblad B, Jönsson L. The worldwide societal costs of dementia: Estimates for 2009. **Alzheimers Dement**; 6 (2): 98-103, 2010.

Winocur G, Roder J, Lobaugh N. Learning and memory in S100-beta transgenic mice: an analysis of impaired and preserved function. **Neurobiol Learn Mem**; 75(2):230–43, 2001.

Xu PT, Li YJ, Qin XJ, Kroner C, Green-Odlum A, Xu H, Wang TY, Schmechel DE, Hulette CM, Ervin J, Hauser M, Haines J, Pericak-Vance MA, Gilbert JR. A SAGE study of apolipoprotein E3/3, E3/4 and E4/4 allele-specific gene expression in hippocampus in Alzheimer disease. **Mol Cell Neurosci**; 36 (3): 313-31, 2007.

Xu PT, Li YJ, Qin XJ, Scherzer CR, Xu H, Schmechel DE, Hulette CM, Ervin J, Gullans SR, Haines J, Pericak-Vance MA, Gilbert JR. Differences in apolipoprotein E3/3 and E4/4 allele-specific gene expression in hippocampus in Alzheimer disease. **Neurobiology of Disease**; 21 (2): 256-75, 2006.

Yammani RR, Carlson CS, Bresnick AR, Loeser RF. Increase in production of matrix metalloproteinase 13 by human articular chondrocytes due to stimulation with S100A4: Role of the receptor for advanced glycation end products. **Arthritis Rheum**; 54 (9): 2901-11, 2006.

Yammani RR, Long D, Loeser RF. Interleukin-7 stimulates secretion of S100A4 by activating the JAK/STAT signaling pathway in human articular chondrocytes. **Arthritis Rheum**; 60 (3): 792-800, 2009.

Yan SD, Chen X, Fu J, Chen M, Zhu H, Roher A, Slattery T, Zhao L, Nagashima M, Morser J, Migheli A, Nawroth P, Stern D, Schmidt AM. RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. **Nature**; 382 (6593): 685-91, 1996.

Yao PJ, Zhu M, Pyun EI, Brooks AI, Therianos S, Meyers VE, Coleman PD. Defects in expression of genes related to synaptic vesicle trafficking in frontal cortex of Alzheimer's disease. **Neurobiol Dis**; 12 (2): 97-109, 2003.

Yssel H, de Waal MR, Roncarolo MG, Abrams JS, Lahesmaa R, Spits H, de Vries JE. IL-10 is produced by subset of human CD⁺ T cell clones and peripheral blood cells. **J Immunol**; 149: 2378– 2384, 1992.

Zainaghi IA, Forlenza OV, Gattaz WF. Abnormal APP processing in platelets of patients with Alzheimer's disease: correlations with membrane fluidity and cognitive decline. **Psychopharmacology (Berl)**; 192 (4): 547-53, 2007.

Zhang Y, McLaughlin R, Goodyer C, LeBlanc A. Selective cytotoxicity of intracellular amyloid beta peptide1-42 through p53 and Bax in cultured primary human neurons. **J Cell Biol**; 156 (3): 519-29, 2002

Zhao C, Takita J, Tanaka Y, Setou M, Nakagawa T, Takeda S, Yang HW, Terada S, Nakata T, Takei Y, Saito M, Tsuji S, Hayashi Y, Hirokawa N. Charcot-Marie-Tooth disease type 2A caused by mutation in a microtubule motor KIF1Bbeta. **Cell**; 105 (5): 587-97, 2001.

Zhu H, Bilgin M, Snyder M. Proteomics. **Annu Rev Biochem**; 720: 783-812, 2003.

Zhu X, Avila J, Perry G, Smith MA, Treuting the lesions not the disease. *Am J Pathol*; 170: 1457-1459, 2007.

Zipser BD, Johanson CE, Gonzalez L, Berzin TM, Tavares R, Hulette CM, Vitek MP, Hovanesian V, Stopa EG. Microvascular injury and blood-brain barrier leakage in Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging**; 28 (7): 977-86, 2007.

Zolotarjova N, Martosella J, Nicol G, Bailey J, Boyes BE, Barrett WC. Differences among techniques for high-abundant protein depletion. **Proteomics**; 5: 3304–13, 2005.

Zubenko GS, Cohen BM, Boller F, Malinakova I, Keefe N, Chojnacki B. Platelet membrane abnormality in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*; 22 (2): 237-44, 1987.

Zvaifler NJ. Relevance of the stroma and epithelial-mesenchymal transition (EMT) for the rheumatic diseases. **Arthritis Res Ther**; 8 (3): 210, 2006.

X – Apêndice

Tabela 12. Data de nascimento, escolaridade, medicação e genótipo para APOE disponível para os indivíduos incluídos no estudo de proteomapor eletroforese bidimensional.

Proteína	Sexo	Diag	DN	Escol.	medicações	APOE
1173	M	DA	01/01/35	4	rivastigmina 6mg	E3/E4
1095	M	DA	12/11/30	4	rivastigmina 3mg, sinvastina 10mg, sertralina 50mg, levodopa 200mg, pramipexol 1mg	E3/E3
1189	M	DA	10/10/39	15	rivastigmina 4,5mg, enalapril 5mg, sinvastatina 10mg	E3/E3
1179	M	DA	31/12/25	nd	(S) donepezil 5mg, sinvastatina 5mg	
1033	M	DA	03/10/38	16	(S) donepezil 5mg, sinvastatina 10mg, risperidona 1mg	E3/E3
1151	F	DA	24/06/25	1	(S) donepezil 10mg	E3/E4
1243	F	DA	04/07/36	4	(S) donepezil 10mg	E3/E3
874	F	DA	20/03/42	14	rivastigmina 12mg, ácido valpróico 250mg, sertralina 50mg	E3/E4
899	F	DA	14/07/29	4	quetiapina 50mg, sertralina 25mg, rivastigmina 6mg	E4/E4
1026	F	DA	07/01/25	2	rivastigmina 3mg	E3/E4
1282	M	Ctrl	04/03/32	18	sem medicação	E2/E3
1303	M	Ctrl	22/07/27	14	metformina 850mg, paroxetina 20mg	E3/E3
975	M	Ctrl	21/1/34	18	sertralina 50mg	E3/E3
1192	M	Ctrl	29/10/25	4	sem medicação	
1091	M	Ctrl	18/7/42	19	paroxetina 20mg	E3/E3
508	F	Ctrl	17/03/39	nd	sertralina 50mg	
506	F	Ctrl	26/05/41	21	sem medicação	E3/E3
1239	F	Ctrl	09/12/35	15	levotiroxina 50mg, paroxetina 20mg	
1195	F	Ctrl	28/03/33	12	sertralina 100mg, gabapentina 600mg	E3/E3
480	F	Ctrl	03/10/43	15	levotiroxina 100mg, fluoxetina 20mg, gabapentina 400mg, metformina 850mg	E3/E3

Diag.: Diagnóstico; DN: Data de nascimento; Escol.: escolaridade; Ctrl: controles; DA: pacientes com doença de Alzheimer; nd: não informado.

Tabela 13. Data de nascimento, escolaridade, medicação e genótipo para APOE disponível para os indivíduos incluídos no estudo de expressão gênica.

RNA	Sexo	Diag	DN	Escola	medicações	APOE
1620	M	DA	10/01/30	0	(S) donepezil 5mg	nd
1630	F	DA	03/08/35	4	sem medicação	nd
1631	F	DA	23/04/31	4	donepezila 5mg, sertralina 50mg, synthroid 50mg	E3/E3
1599	F	DA	07/04/35	4	sem medicação	nd
1612	M	DA	10/10/39	15	rivastigmina 3mg, fluoxetina 20mg, sertralina 50mg, hidroclorotiazida 25mg	E3/E3
1692	M	DA	02/02/39	16	rivastigmina 6mg, sertralina 50mg, atorvastatina 10mg, risperidona 1mg	nd
1706	F	DA	04/05/36	nd	divalproato de sódio 500mg, (S)donepezil 5mg, enalapril 20mg	nd
1704	F	DA	12/10/29	4	galantamina 24 mg, sinvastatina 10mg, risperidona 1,5 mg, paroxetina 20mg	E3/E4
1696	F	DA	05/08/21	3	quetiapina 25mg, (s)donepezil 5mg	E3/E3
1698	F	DA	25/06/20	18	rivastigmina 12mg, risperidona 1mg	E3/E3
1697	M	DA	05/12/28	17	olanzapina 2,5 mg, sertralina 50mg, rivastigmina 6mg	E3/E3
1708	F	DA	14/09/19	4	sem medicação	nd
1730	F	DA	28/11/32	4	(S) donepezil 10mg, sinvastatina 10mg, sertralina 50mg	nd
1743	F	DA	21/07/24	4	rivastigmina 6mg, olanzapina 5mg, zolpidem 5mg	nd
1755	F	DA	24/05/25	1	(S) donepezil 10mg, sertralina 50mg	E3/E4
1763	F	DA	04/03/28	4	rivastigmina 6mg, sertralina 25mg, sinvastatina 5mg, levotiroxina 37,5mcg, bromazepam 1,5mg	nd
1766	F	DA	01/07/25	2	rivastigmina 3mg, mirtazapina 15mg, amitriptilina 25mg	E3/E4
1767	F	DA	15/03/18	11	rivastigmina 12mg, sertralina 25mg	E2/E3
1768	F	DA	21/06/24	4	(S) donepezil 10mg, olanzapina 5mg, enalapril 5 mg	nd
1793	F	DA	29/09/30	4	(s)donepezil	E3/E4
1695	F	Ctrl	09/12/35	15	levotiroxina 50mg	E3/E3
1709	F	Ctrl	26/05/41	21	sem medicação	E3/E3
1694	F	Ctrl	21/03/33	20	sertralina 50mg, zolpidem 10mg	E3/E3
1701	M	Ctrl	08/05/38	18	sem medicação	E3/E4
1699	F	Ctrl	12/12/36	15	sertralina 100mg, zolpidem 10mg, sinvastatina 10mg	E3/E3
1700	F	Ctrl	10/05/37	13	sertralina 50mg, atorvastatina 10mg	E3/E3
1702	F	Ctrl	07/09/42	19	sem medicação	E3/E3
1693	F	Ctrl	28/03/33	12	sertralina 100mg, gabapentina 600mg	E3/E3
1726	M	Ctrl	21/01/34	18	sem medicação	E3/E3
1731	F	Ctrl	05/02/40	11	fluoxetina 20mg, levotiroxina 25mcg	E3/E3
1732	F	Ctrl	02/12/41	5	fluoxetina 20mg	nd
1734	F	Ctrl	10/01/38	18	sem medicação	E2/E3
1735	M	Ctrl	16/05/36	12	sem medicação	E3/E3
1736	F	Ctrl	10/05/37	2	hidroclorotiazida 25mg, sinvastatina 10mg	nd
1742	F	Ctrl	24/05/27	17	sem medicação	E3/E4
1754	F	Ctrl	03/07/37	20	sem medicação	E3/E3
1756	F	Ctrl	24/05/27	8	espironolactona 25mg, digoxina 0,25mg, carvedilol 50mg, amiodarona 400mg, levotiroxina 25mcg, varfarina 5mg, enalapril 40mg, furosemida 40mg, sinvastatina 30mg	E2/E2
1795	M	Ctrl	28/07/44	nd	sem medicação	nd
1794	F	Ctrl	23/04/39	15	hidroclorotiazida 25mg, enalapril 40mg, atenolol 50mg	E3/E3
1792	F	Ctrl	31/01/30	11	sem medicação	E2/E3

Diag.: Diagnóstico; DN: Data de nascimento; Escola.: escolaridade; Ctrl: controles; DA: pacientes com doença de Alzheimer; nd: não informado.

XI – Biografia

A aluna Maria Carolina Pedro Athié graduou-se em Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas (Modalidade: Molecular) pela Universidade Estadual de Campinas, entre 2003-2006. Durante este período, realizou a produção de um mini-projeto intitulado “Detecção da expressão gênica de antígenos associados a tumor em linhagens de leucemias linfóides agudas por análise *in silico* de *microarrays*.” Que recebeu, em 2005, o prêmio de segundo-lugar para trabalhos de iniciação científica no 55º Congresso Brasileiro de Genética. Também nesse período, a aluna realizou sua iniciação científica no laboratório de Genética Molecular do Câncer, sob orientação da Dra. Laura Sterian Ward, sob o título “Análise de polimorfismos do gene *CYP1B1* e sua correlação com o risco para o desenvolvimento do câncer da próstata e da tireóide”. Este projeto obteve financiamento da FAPESP e recebeu, em 2007, *travel grant* no XII Congresso da Sociedade Lationo-Americano de Tireóide.

Em 16 de julho de 2007 a aluna ingressou no programa de mestrado em Biologia (Genética) do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Além de seu projeto, intitulado “Análise da expressão gênica e proteômica em pacientes com doença de Alzheimer: busca de marcadores periféricos”, a aluna também colaborou para a execução de um trabalho submetido na forma de artigo para a publicação: Calais JB, Quevedo J, Valvassori SS, Feier G, Barichello T, **Athié MCP**, Ribeiro S, Gattaz WF and Ojopi EB. “Decrease in immediate early gene expression one month after electroconvulsive seizures” (submetido para *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*).

Com a conclusão do seu projeto de pesquisa de Mestrado, a aluna pretende continuar a se aprimorar e seguir o meio acadêmico na área de Neurociências, com ênfase em genética e biologia molecular.