

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

CAROLINA PARGA MARTINS PEREIRA

**Estudo das atividades de reparo de DNA por excisão
de bases em extratos mitocondriais de cérebros de
indivíduos normais e acometidos pela doença de
Alzheimer**

Versão corrigida da dissertação

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
07/02/2014

CAROLINA PARGA MARTINS PEREIRA

Estudo das atividades de reparo de DNA por excisão de bases em extratos mitocondriais de cérebros de indivíduos normais e acometidos pela doença de Alzheimer

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Mestre em Ciências (Bioquímica)

Orientadora: Profa. Dra. Nadja C. de Souza Pinto

São Paulo

2014

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Pereira, Carolina Parga Martins
P436e Estudo das atividades de reparo de DNA por excisão de bases em extratos mitocondriais de cérebros de indivíduos normais e acometidos pela doença de Alzheimer / Carolina Parga Martins Pereira. -- São Paulo, 2014.
115p.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador : Souza-Pinto, Nadja Cristhina de

1. Biologia molecular 2. Doença de Alzheimer 3. Mitocôndrias
4. DNA mitocondrial I. T. II. Souza-Pinto, Nadja Cristhina de, orientador.

574.88 CDD

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à minha orientadora e amiga Profa. Dra. Nadja Cristhina de Souza Pinto pela orientação, pelas discussões científicas, por contribuir no meu desenvolvimento pessoal e científico, e por sempre acreditar no meu potencial.

Ao Prof. Dr. José Marcelo Farfel pelas conversas científicas, pela oportunidade de fazer parte da equipe do Gerolab e por tornar esse trabalho possível, auxiliando no seu desenvolvimento.

Ao Prof. Dr. Wilson Jacob Filho pelas discussões enriquecedoras, sempre com questionamentos pertinentes e intrigantes durante a pesquisa.

Ao Prof. Dr. Carlos Augusto Pasqualucci por permitir que as amostras provenientes do SVOC fossem utilizadas nesse trabalho. Sem seu apoio, o andamento desse estudo não seria possível.

Aos membros coordenadores do BEHEGEEC por me aceitarem como integrante do laboratório, concedendo a oportunidade de enriquecer meu aprendizado na área de envelhecimento, por acreditarem no desenvolvimento desse estudo, auxiliando tanto na obtenção das amostras humanas quanto nas questões científicas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro concedido para a realização dessa pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão de bolsa para o desenvolvimento dessa dissertação (processo nº 33002010017P0).

Aos meus queridos pais Alberto Carlos Pereira Filho e Cláudia Parga Martins Pereira, pelo apoio e força em toda a minha trajetória de vida, principalmente nos passos da minha formação. Muito obrigada pelo incentivo, pelos conselhos, pelo conforto, pelas palavras de carinho, pelas brigas e por acreditarem a cada dia no meu crescimento pessoal e profissional. Agradeço, principalmente, pela formação do meu caráter e dos meus valores, que foram fundamentais nesta etapa da minha vida. Sem dúvidas, todas as minhas conquistas não seriam possíveis sem vocês, sendo esta a materialização de uma das mais importantes.

Aos meus irmãos, Leonardo e Rafaela, pelas noites em claro discutindo assuntos referentes à vida, pelo colo nos momentos difíceis, por me mostrarem que o amor supera qualquer distância e por sempre estarem presentes nesses anos, compartilhando todos os momentos.

Aos meus avós, tios e primos pelo apoio, pelo incentivo e por terem acreditado nas minhas conquistas.

À Adriana M. P. Wendel, pela amizade, pelos conselhos tanto profissionais quanto pessoais, além do carinho e prestatividade sempre presentes.

Aos integrantes do laboratório de Genética Mitocondrial pela amizade, pelas discussões científicas, pelo auxílio nas horas difíceis e pelos momentos agradáveis dentro e fora do laboratório.

À Dra. Daniela T. Soltys por me acompanhar no desenvolvimento desse trabalho sempre me auxiliando nos aspectos teóricos e práticos da pesquisa, bem como pela amizade, pela força nos momentos difíceis e pelo carinho.

À Profa. Dra. Alicia Kowaltowski e aos integrantes do seu laboratório pela prestatividade, pelo apoio, pelo uso de materiais e equipamentos e pelas discussões científicas.

Aos integrantes do Gerolab pela amizade, pelo apoio e por me auxiliarem sempre que necessário. Em especial, agradeço a Mariana Molina pela amizade, pelo carinho, pelo exemplo de dedicação, por me ajudar na separação das amostras utilizadas nesse estudo e pela prestatividade sempre presente, me ajudando em todos os momentos. À Luzia Lima pela amizade, por me fazer acreditar no meu potencial, pelo apoio, pelas conversas enriquecedoras, e por me ensinar os procedimentos de coleta de encéfalos. À Camila Nascimento pela amizade, pelo carinho, pelas discussões científicas e pelos momentos agradáveis que passamos juntas. À Keila Maria Silva pelo apoio, pelas conversas e conselhos, por me ajudar sempre que precisei e por estar presente em todos os momentos.

Aos meus queridos amigos Carolina Carvalho, Cristiane Garcia, Juliana Della Nina, Gabriela Naomi, Felipe Godoy, Gustavo Dias, Adriana Domarques, Maíra Nagaí, Luíza Barros, Elise Albejante, Felipe Ravagnani, Aline Campos, Fábio Perin, Tamie Nezu, Raphael Baston, Débora Freitas e Rodrigo Avelaira pelas conversas intermináveis, pelo companheirismo, por ajudarem nos momentos difíceis, pelos inúmeros momentos de risadas, pelos conselhos e por terem me mostrado o verdadeiro significado da palavra amizade.

Agradeço a todos os funcionários da USP que participaram direta ou indiretamente da minha formação. Em especial, agradeço ao corpo docente (meus professores ou não) pelos conhecimentos compartilhados, pelas conversas construtivas e por contribuírem na minha formação pessoal e acadêmica.

Finalmente, agradeço a todas as pessoas que, por ventura, eu possa ter me esquecido de citar, mas que acrescentaram peças importantes no meu crescimento ao longo desses anos.

Muito obrigada!

“A viagem nunca termina, o itinerário é recomposto a cada estação e o destino final é sempre desconhecido”.

Zygmunt Bauman

Pereira, C.P.M. **Estudo das atividades de reparo de DNA por excisão de bases em extratos mitocondriais de cérebros de indivíduos normais e acometidos pela doença de Alzheimer.** 2014.115 p. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O envelhecimento da população mundial no último século elevou significativamente o número de casos da doença de Alzheimer (DA), bem como os custos para os sistemas de saúde pública. Apesar de avanços significativos no entendimento da fisiopatologia da doença, pouco se sabe a respeito dos mecanismos moleculares que desencadeiam a perda de memória e a morte neuronal. Resultados recentes sugerem que o acúmulo de bases oxidadas no DNA mitocondrial e alterações nas vias que removem essas lesões desempenham um papel importante na morte neuronal observada em DA. A maioria das lesões em DNA induzidas oxidativamente são removidas pela via de reparo por excisão de bases (BER, do inglês *Base Excision Repair*). Resultados da literatura mostraram que a atividade da via BER está reduzida no lóbulo parietal e no cerebelo de pacientes com DA, quando comparadas com amostras de indivíduos com cognição normal da mesma faixa etária. Entretanto, esse trabalho mediu a atividade de BER apenas em extratos celulares totais. No presente estudo, foram medidas as atividades de BER em extratos mitocondriais de cérebros de indivíduos com DA, uma vez que lesões no DNA mitocondrial acumulam mais significativamente nos pacientes. Para testar a hipótese que alterações em BER mitocondrial estão associadas ao desenvolvimento da doença, foram analisadas atividades de BER em mitocôndrias em duas regiões cerebrais de indivíduos normais, indivíduos com DA e um grupo de indivíduos que apresentam alterações neuropatológicas de DA (agregados proteicos), porém que se mantiveram cognitivamente normais, nomeados DA assintomático. A atividade da enzima AP endonuclease apresentou-se elevada no cerebelo do grupo DA assintomático, enquanto que não apresentou variação no córtex temporal. Esses resultados sugerem que a preservação de APE1 no grupo DA assintomático pode exercer um papel protetor às lesões neuropatológicas, bem como indicar que as regiões

cerebrais apresentam suscetibilidade distinta aos danos. Já a atividade de uracil DNA glicosilase está reduzida no cerebelo tanto em indivíduos com DA quanto com DA assintomático, quando comparados ao grupo controle, enquanto que, no córtex temporal, a redução é verificada somente no grupo DA. Além disso, observou-se que a atividade de UDG e o critério Braak apresentam uma correlação negativa. Os resultados referentes à enzima UDG sugerem que a redução da sua atividade compromete a viabilidade neuronal tornando as células mais propensas às lesões da DA. Assim, o comprometimento da via BER em mitocôndrias de cérebros humanos pode contribuir para os eventos moleculares que ocasionam a morte neuronal associada ao desenvolvimento de DA.

Palavras-chave: Reparo por excisão de bases, DNA mitocondrial, mitocôndria, doença de Alzheimer

Pereira, C.P.M. **BASE EXCISION REPAIR ACTIVITIES IN MITOCHONDRIA FROM BRAINS FROM NORMAL AND ALZHEIMER'S DISEASE SUBJECTS.** 2014. 115 p. Masters Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The number of Alzheimer's disease cases (AD) has increased steadily over the last century, paralleling a sharp rise in mean life expectancy. Consequently, AD-associated public health costs have also increased. Despite several important findings in AD physiopathology, a clear understanding of the molecular events leading to memory loss and neuronal death is still lacking. Recent results show that oxidized DNA lesions accumulate in mitochondrial DNA in neurodegenerative diseases, including AD. Moreover, alterations in DNA repair may also play a causative role in neuronal death. Most oxidized lesions are repaired by the Base Excision Repair (BER) pathway. It has been recently shown that BER activities are reduced in whole cell extracts from parietal lobule and cerebellum from AD patients, when compared with age-matched controls. As accumulation of oxidized bases is seen more prominently in mitochondrial DNA, here we investigated whether changes in BER activities in mitochondria are associated with the development of AD. Thus, we measured BER activities in mitochondria from two brain regions from age-matched normal individuals, AD patients and a group of individuals that show AD-like neuropathological alterations but remained cognitively normal, thus called asymptomatic AD. AP endonuclease activity is elevated in asymptomatic AD cerebellum, while not changed in temporal cortex. These results suggest that APE1 activity in asymptomatic AD may play a protective role against neuropathological lesions, and indicate that brain regions show different susceptibility to damage. On the other hand, uracil DNA glycosylase activity is reduced in cerebellum in both AD and asymptomatic individuals, when compared to controls. In temporal cortex, this reduction is observed only in AD group. In addition, UDG activity and Braak stage showed a significant negative correlation. These results indicate that decreased UDG activity may compromise neuronal viability, making the cells more prone to AD lesions. Thus,

impairment of BER in human brain mitochondria may contribute to the molecular events that cause neuronal death during the development of this disease.

Keywords: Base Excision Repair, mitochondria, mitochondrial DNA, Alzheimer's disease

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Doença de Alzheimer (DA)	15
1.2. Bases moleculares da DA	17
1.3. Modificações oxidadas no DNA em DA.....	21
1.4. A via de reparo por excisão de bases (<i>Base Excision Repair</i> , BER)	23
1.5. A via BER e a DA	27
2. OBJETIVOS	29
2.1. Objetivo geral	30
2.2. Objetivos específicos	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1. Grupos Experimentais	32
3.2. Isolamento das frações mitocondriais das amostras congeladas.....	33
3.3. Verificação da pureza das frações mitocondriais	34
3.3.1. <i>Separação de proteínas por SDS-PAGE</i>	34
3.3.2. <i>Western Blotting</i>	34
3.4. Preparação dos extratos mitocondriais	35
3.5. Medidas das atividades de BER.....	36
3.5.1. <i>Marcação fluorescente dos oligonucleotídeos para os ensaios in vitro</i>	37
3.5.2. <i>Ensaio de incisão de oligonucleotídeos</i>	38
3.6. Medida da atividade de citrato sintase	39
3.7. Análises estatísticas.....	39

4. RESULTADOS	41
4.1. Caracterização dos grupos experimentais	42
4.2. Análise da pureza das frações mitocondriais	45
4.2.1. <i>Análise da pureza em cerebelo</i>	45
4.2.2. <i>Análise da pureza em córtex temporal</i>	50
4.3. Preparo e verificação dos substratos para os ensaios enzimáticos	52
4.4. Ensaio da atividade de AP endonuclease (APE1)	55
4.4.1. <i>Medida da atividade de APE1 em cerebelo de indivíduos com critérios de exclusão</i>	55
4.4.2. <i>Análise da atividade de APE1 em cerebelo dos grupos experimentais</i>	58
4.4.3. <i>Medida da atividade de APE1 em córtex temporal de indivíduos com critérios de exclusão</i>	61
4.4.4. <i>Análise da atividade de APE1 em córtex temporal dos grupos experimentais</i>	64
4.5. Correlação entre a atividade de APE1 e critérios sócio-demográficos ..	67
4.5.1. <i>Correlação entre a atividade de APE1 e a idade</i>	67
4.5.2. <i>Correlação entre a atividade de APE1 e a escolaridade</i>	68
4.6. Correlação entre a atividade de APE1 e critérios neuropatológicos	70
4.6.1. <i>Correlação entre a atividade de APE1 e o estágio Braak</i>	70
4.6.2. <i>Correlação entre a atividade de APE1 e CERAD</i>	71
4.7. Ensaio da atividade de Uracil DNA glicosilase (UDG)	73
4.7.1. <i>Medida da atividade de UDG em cerebelo de indivíduos com critérios de exclusão</i>	73
4.7.2. <i>Análise da atividade de UDG em cerebelo dos grupos experimentais</i>	75
4.7.3. <i>Medida da atividade de UDG em córtex temporal de indivíduos com critérios de exclusão</i>	77
4.7.4. <i>Análise da atividade de UDG em córtex temporal dos grupos experimentais</i>	78
4.8. Correlação entre a atividade de UDG e critérios sócio-demográficos ...	80
4.8.1. <i>Correlação entre a atividade de UDG e a idade</i>	80
4.8.2. <i>Correlação entre a atividade de UDG e a escolaridade</i>	82
4.9. Correlação entre a atividade de UDG e critérios neuropatológicos	83
4.9.1. <i>Correlação entre a atividade de UDG e o estágio Braak</i>	83

4.9.2. <i>Correlação entre a atividade de UDG e CERAD</i>	85
4.10. Ensaio da atividade de oxoguanina DNA glicosilase (OGG1)	86
4.10.1. <i>Medida da atividade de OGG1 em cerebelo de indivíduos com critérios de exclusão</i>	86
5. DISCUSSÃO	91
6. CONCLUSÕES	104
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
8. ANEXO	116

1. Introdução

1.1. Doença de Alzheimer (DA)

No Brasil, uma transição demográfica, caracterizada pela diminuição da taxa de crescimento populacional com redução do número de crianças e adolescentes e aumento da população em idade ativa e de idosos, ocorreu de forma significativa após 1960, sendo considerada uma das mais importantes mudanças estruturais verificadas na sociedade brasileira (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2009).

O envelhecimento populacional ocorre de maneira acelerada, e segundo as projeções do IBGE (2009), o número de idosos (acima de 60 anos) em 2030 irá superar o número de crianças (menores de 15 anos de idade) em torno de 4 milhões. Em 2050, essa diferença passará para 35,8 milhões, totalizando nesse ano 64,1 milhões de idosos. A alta proporção de idosos traz consequências diretas aos sistemas de saúde pública, como o aumento dos custos dos tratamentos médico-hospitalares decorrentes, principalmente, do aumento da incidência e prevalência das doenças associadas à idade, como por exemplo, a doença de Alzheimer.

A doença de Alzheimer (DA) é o principal tipo de demência que acomete indivíduos idosos, acima de 60 anos. A prevalência de demência, que na faixa etária entre 65 e 69 anos é de aproximadamente 1 em 100 indivíduos, dobra em intervalos de 5 anos a partir dos 69 anos em países desenvolvidos (Jorm et al., 1987; Hy e Keller, 2000). Estima-se que a prevalência de demência varie entre 20% e 50% para indivíduos com idade superior a 85 anos (Evans et al., 1989). Entre 50% a 80% de todas as demências associadas à idade decorrem da doença de Alzheimer, isoladamente ou em associação com outros quadros fisiopatológicos (Hendrie et al., 1995; Graves et al., 1996).

O termo demência pode ser definido como declínio de memória associado ao comprometimento de pelo menos outra função cognitiva (linguagem, gnosis, praxia ou funções executivas), com intensidade suficiente para causar um impacto significativo nas atividades sócio-ocupacionais do indivíduo. Clinicamente, a demência do tipo Alzheimer caracteriza-se por comprometimento da memória recente seguida pelo desenvolvimento de afasia, apraxia e agnosia. Alguns indivíduos podem apresentar

mudanças na personalidade ou aumento da irritabilidade nos estágios iniciais. Nos estágios tardios da doença, podem desenvolver distúrbios motores e, eventualmente, tornarem-se mudos e acamados. A duração média do quadro clínico, do início dos sintomas até a morte, é de 8 a 10 anos (American Psychiatric Association, 1994).

Do ponto de vista neuropatológico, a DA caracteriza-se pela presença de placas neuríticas (PN) e emaranhados neurofibrilares (ENF) no parênquima cerebral, os quais foram descritos em 1907, respectivamente por Fischer e Alzheimer. As placas consistem em depósitos extracelulares de agregados fibrilares ou amorfos do peptídeo β -amilóide (β A), enquanto que os emaranhados neurofibrilares são agregados fibrilares da proteína tau associada ao microtúbulo (Mattson, 2004).

Por outro lado, Gellerstedt (1933) demonstrou que esses dois tipos de lesões podem ser encontrados na maioria dos idosos com cognição normal, o que levou ao questionamento se PN e ENF seriam realmente relacionados à doença ou ao processo de envelhecimento *per se*. Os estudos de Roth et al. (1966), demonstraram que a demência estava associada a maiores concentrações e padrões específicos de distribuições destes marcadores. No entanto, persistia a dúvida de qual o limite mínimo de lesão que poderia desencadear o surgimento da doença, e qual o grau máximo de lesão que poderia ser tolerado sem prejuízos cognitivos. Com o propósito de determinar este limiar neuropatológico entre a cognição normal e a doença, foram criados os critérios de diagnóstico e estadiamento atualmente utilizados: estágios de Braak e Braak (Braak e Braak, 1991); critérios do CERAD (Morris et al., 1988) e do NIA-RI (*National Institute on Aging and Reagan Institute*).

Após a criação destes critérios, foram descritos indivíduos livres de demência, porém que apresentavam lesões cerebrais avançadas, sendo assim, classificados como acometidos de DA em estágio pré-clínico ou assintomático (Schmitt et al., 2000). Estes indivíduos representam um desafio para a identificação de um limite máximo de lesões cerebrais toleradas por um indivíduo, sem a manifestação de demência.

Segundo Knopman et al. (2003), a maioria dos idosos livres de demência apresentam algum tipo de indicador neuropatológico de DA em estágio leve. Apenas cerca de 10% apresentam graus moderados ou avançados de placas neuríticas corticais, e 13% demonstram estágios avançados de emaranhados neurofibrilares, segundo a classificação de Braak e Braak (1991) (estágios de Braak e Braak \geq IV). No entanto, pesquisas mais recentes encontraram indivíduos acometidos pela DA assintomático em estágio avançado, em porcentagem superior àquela descrita por Knopman et al. (2003). Bennett et al. (2006) avaliaram idosos livres de demência e comprometimento cognitivo leve (CCL), um estágio pré-clínico descrito por Petersen et al. (1999), e encontraram 36 - 46% de prevalência de indivíduos com lesões cerebrais de DA em estágio avançado. Os autores concluíram que não seria possível determinar um limiar máximo de lesões neuropatológicas em indivíduos considerados cognitivamente normais, propondo que os idosos com DA assintomático estariam protegidos contra o surgimento de demência, por algum mecanismo desconhecido que permitiria tolerar a agressão causada pelas lesões cerebrais, sem desenvolver sintomas.

1.2. Bases moleculares da DA

Os casos de DA podem ser classificados como esporádicos ou familiares, dependendo da identificação de mutações específicas que são epidemiologicamente associadas com a incidência de DA. A identificação dessas mutações e a caracterização funcional dos respectivos produtos proteicos têm contribuído significativamente para a elucidação das vias moleculares relacionadas ao desenvolvimento da doença (Ryan e Rossor, 2010). Até o momento, diversas mutações em *loci* distintos foram associadas ao desenvolvimento de DA familiar em várias populações. Desses, os genes com mutações identificadas e melhor caracterizadas são os que codificam a proteína precursora de β amiloide (APP1), a proteína tau e presenilina-1 (PS-1).

A APP1 consiste em uma proteína transmembrana com um domínio extracelular de 616 aminoácidos, um domínio transmembrana e um pequeno domínio citoplasmático carboxi-terminal. Evidências sugerem que as possíveis funções dessa proteína são: regulação da sobrevivência neuronal, estimulação do crescimento de neuritos, modulação da plasticidade sináptica, regulação da adesão celular e proteção contra insultos metabólicos e oxidativos (Mattson, 1997). Esta proteína é substrato para a clivagem por três secretases distintas, α -, β - e γ -secretases. A clivagem de APP1 pela α -secretase é estimulada pela atividade elétrica neuronal e gera isoformas solúveis de APP (sAPP α) que impedem a formação do peptídeo beta amilóide, uma vez que a clivagem ocorre no meio da sequência de aminoácidos que formam o peptídeo. Entretanto, quando APP1 é clivada pela β -secretase, ocorre liberação de um fragmento C-terminal, que contém a sequência intacta do β A. Este fragmento é processado pela γ -secretase, resultando na formação do peptídeo β A, contendo entre 39 a 43 aminoácidos (painel A da Figura 1) (Mattson, 1997).

A enzima γ -secretase apresenta quatro diferentes subunidades: presenilina, nicastrina, Aph-1 e Pen-2. O sítio ativo da γ -secretase depende da atividade aspartil protease conferida pelos resíduos de aspartato da presenilina (PS). PS foi inicialmente identificada como uma proteína geneticamente ligada a DA, visto que mutações nos homólogos PS1 e PS2 estão associadas ao tipo de DA familiar. As mutações características da DA familiar afetam a especificidade da clivagem da enzima, aumentando a quantidade de β A e a formação das placas (Steiner et al., 2008).

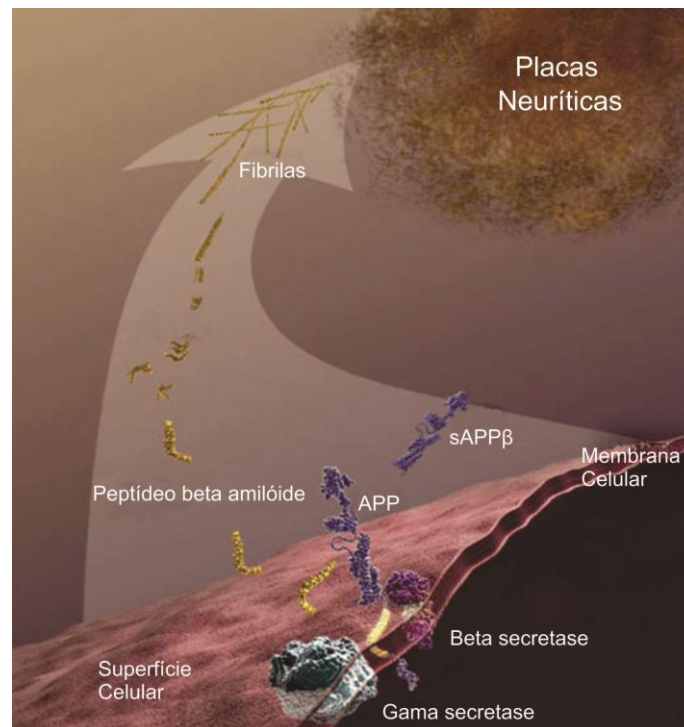
Além disso, estudos recentes apontam que a superexpressão das formas mutantes de PS1 em culturas de células neuronais aumentam os níveis de cálcio citoplasmático quando estimulados por agonistas, que induzem a liberação de cálcio do retículo endoplasmático. Um dos efeitos da alteração da homeostase intracelular de cálcio é a disfunção mitocondrial, o que contribui para a morte neuronal em DA (Mattson, 2003).

Os emaranhados neurofibrilares são caracterizados pela hiperfosforilação e precipitação da proteína tau. Esse evento molecular também está relacionado com

mutações em PS1. Além de auxiliar na catálise da γ -secretase, PS1 pode estimular a via de PI3K/Akt (Fosfatidilinositol 3 – cinase / Akt cinase) que promove a sobrevivência celular. A ativação dessa via fosforila a principal cinase da proteína tau, GSK-3 (glicogênio cinase sintase 3), inativando-a. Entretanto, quando PS1 apresenta mutações características da DA familiar, a via de PI3K/Akt fica comprometida, e ocorre um aumento na atividade de GSK-3, que estimula a fosforilação da proteína tau, promovendo a formação dos emaranhados (Baki et al., 2004).

Em células nervosas, tau é a principal proteína associada ao microtúbulo e tem como função interagir com a tubulina, promovendo sua organização nos microtúbulos, bem como auxiliando na estabilização da sua estrutura. Por ser uma fosfoproteína, a atividade biológica de tau é dependente do seu grau de fosforilação. Quando hiperfosforilada, essa proteína sequestra as isoformas normais inibindo a sua ligação com a tubulina, o que impede a manutenção do microtúbulo, que por sua vez, prejudica a funcionalidade celular (painel B da Figura 1) (Iqbal et al., 2009).

A.



B.

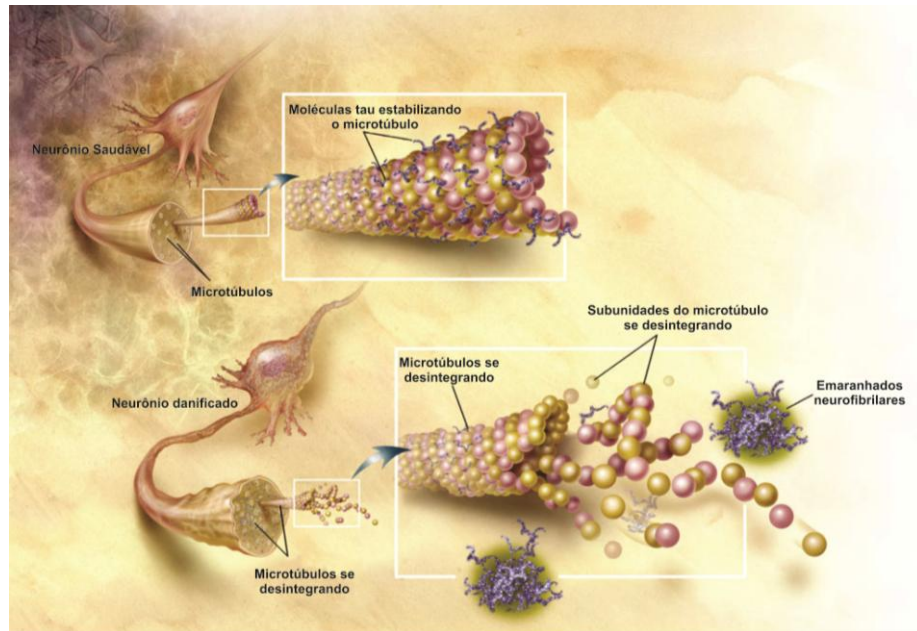


Figura 1. Esquema da formação das duas principais modificações neuropatológicas características da doença de Alzheimer, placas neuríticas e emaranhados neurofibrilares. A – Formação do peptídeo beta amilóide por meio da clivagem da proteína precursora da beta amilóide (APP1) pelas enzimas β - e γ - secretase. O acúmulo do peptídeo na forma de fibrilas resulta na formação da placa neurítica. **B –** Em uma célula nervosa normal, a proteína tau é constituinte do microtúbulo e desempenha a função de estabilizá-lo, bem como de auxiliar no transporte de nutrientes e de componentes celulares. Na doença de Alzheimer, a proteína tau apresenta-se hiperfosforilada, resultando no desprendimento da proteína tau do microtúbulo, desestabilização do citoesqueleto e acúmulo da proteína tau, formando o emaranhado neurofibrilar. Adaptada de NIA (*National Institute of Aging*).

Entretanto, cerca de 90% dos casos confirmados de DA não apresentam histórico familiar ou não possuem mutações identificadas nos pacientes (Moro et al., 2010). Apesar de não serem associados a mutações definidas, os casos esporádicos apresentam algumas alterações comuns, que sugerem a existência de mecanismos moleculares convergentes que levam ao desenvolvimento do quadro anatomopatológico. Dentre essas, o acúmulo de modificações oxidadas em DNA em pacientes DA, quando comparados aos controles da mesma faixa etária, pode ter implicações significativas na indução de morte das células nervosas observada na demência. Esse aumento nos níveis de bases oxidadas foi observado tanto em DNA

extraído de cérebro quanto de líquido cefalorraquidiano, e também em DNA de linfócitos, sugerindo um papel central para alterações no metabolismo redox no desenvolvimento da doença (Lovell e Markesbery, 2007). De fato, o próprio peptídeo β -amilóide possui propriedades pró-oxidantes e pode induzir oxidação do DNA em células em cultura (Harris et al., 1995).

1.3. Modificações oxidadas no DNA em DA

Segundo o estudo de Mecocci et al. (1993), os níveis de bases oxidadas, em especial 8-oxo-7,8-diidroguanina (8-oxoGua), aumentam progressivamente no envelhecimento normal, tanto no DNA mitocondrial (DNAMt) quanto no DNA nuclear (DNA_n), sendo esse aumento mais significativo no DNAMt. Os resultados de um estudo que quantificou seis diferentes bases oxidadas, tanto no DNAMt quanto no DNA_n, em indivíduos com DA e normais em diferentes regiões cerebrais (lobo parietal, frontal, temporal e cerebelo) mostraram um aumento significativo nas lesões do DNA em indivíduos com DA quando comparados com o grupo controle. Esse mesmo estudo também encontrou que os níveis de bases oxidadas no DNAMt eram aproximadamente 10 vezes superiores ao DNA_n (Wang et al., 2005). Esses dados sugerem que a neurodegeneração presente na doença de Alzheimer está associada ao acúmulo de dano oxidativo no DNA, principalmente no mitocondrial.

Lesões oxidadas em DNA decorrem do ataque de espécies reativas de oxigênio (EROs), particularmente do radical hidroxila, que são formadas como produtos da redução incompleta do oxigênio molecular por transferências monoelétrônicas (Halliwell e Aruoma, 1991). Essas espécies podem atacar tanto o açúcar quanto a base do nucleotídeo, gerando quebras de fita simples e bases oxidadas, respectivamente. Mais de cem modificações oxidadas distintas já foram identificadas em DNA exposto a oxidantes, sendo que as predominantes *in vivo* são as quebras de fita simples e as bases oxidadas 8-oxoGua e formamidopirimidinas (Fapys) (Cooke et al., 2003). Algumas dessas lesões, como quebras de fita simples, sítios abásicos e algumas bases oxidadas, são potentes bloqueadores de polimerases, tanto DNA quanto RNA

polimerases, e desta forma, podem levar a morte celular por bloqueio da replicação celular e transcrição (Aller et.al, 2007). Por outro lado, várias bases oxidadas não são bloqueadores de DNA polimerases e, portanto, não inibem a síntese de DNA. Entretanto, essas modificações podem parear erroneamente, o que resulta em um evento mutagênico. Durante a replicação do DNA, a base oxidada 8-oxoGua pode parear com adenina ao invés de seu par canônico citosina, o que resulta em uma mutação de transversão de G:C → T:A (Shibutani et al., 1993).

Além dos efeitos diretos das lesões oxidadas, produtos intermediários das vias de reparo podem acumular em condições nas quais há um desequilíbrio entre as etapas sequenciais responsáveis pela restauração da integridade do DNA. Esses intermediários, como sítios abásicos e quebras de fita simples, são potentes bloqueadores de polimerases e podem desempenhar um papel relevante no efeito biológico do acúmulo de modificações oxidadas.

A localização do DNAm_t na face interna da membrana mitocondrial interna torna-o um alvo celular preferencial ao ataque de EROs, uma vez que um dos principais sítios de geração dessas espécies está localizado na membrana mitocondrial interna. O radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é a principal ERO gerada pela cadeia de transporte de elétrons, resultante da redução monoelétrica do O_2 . A formação dessa espécie ocorre, majoritariamente, nos complexos I e III. Este radical é dismutado em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), por meio da atividade das superóxidos dismutases: Mn-SOD e Cu, Zn-SOD. O H_2O_2 é significativamente mais estável e pode ser removido por um sistema antioxidante (glutathione peroxidase/reductase, peroxirredoxinas) localizado na matriz mitocondrial. Caso o H_2O_2 não seja metabolizado pelo sistema antioxidante, na presença de metais de transição como ferro e cobre, pode ocorrer a formação do radical hidroxila ($\cdot OH$) por meio da reação de Fenton (Kowaltowski et al., 2009). Esse radical é altamente reativo, reagindo com qualquer biomolécula em um raio de 15 Å do sítio de formação. Logo, a proximidade do DNAm_t com o sítio de formação de EROs torna essa biomolécula um alvo preferencial da oxidação por EROs, com consequente

formação de quebras da fita, bem como a oxidação das bases (Figura 2)(Souza-Pinto et al., 2008).

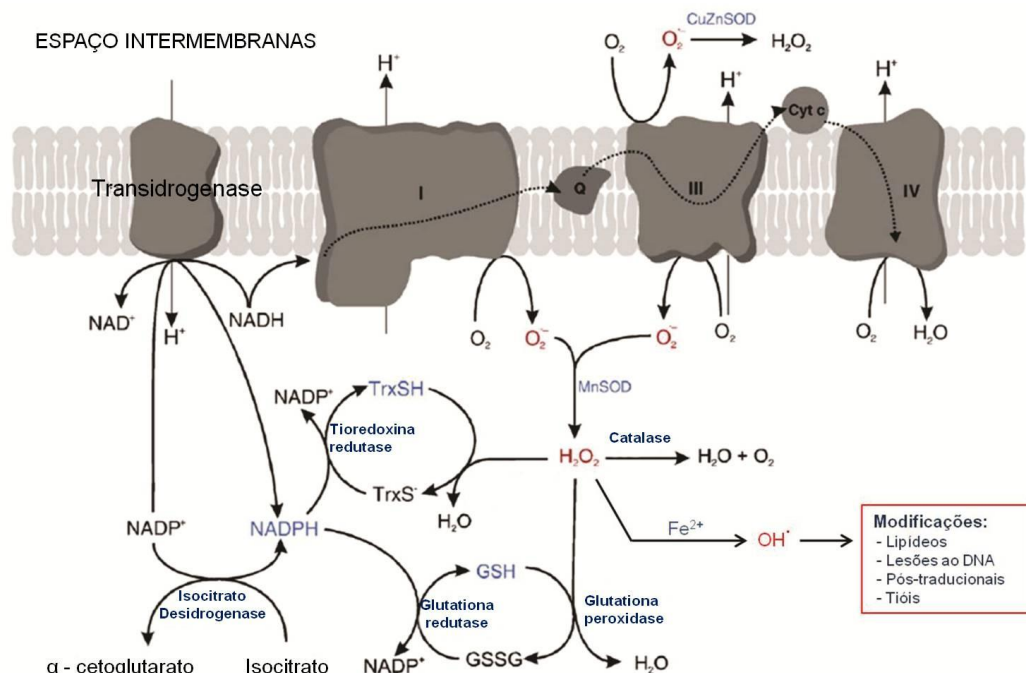


Figura 2. Esquema da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) na matriz mitocondrial e da sua remoção por meio de sistemas antioxidantes. O principal ERO formado na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial é o radical ânion superóxido de oxigênio ($O_2^{\cdot-}$). Este radical é gerado a partir da redução monoelétrica do oxigênio, principalmente, nos complexos I e III. $O_2^{\cdot-}$ é dismutado em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pelas seguintes superóxidos dismutase: Cu, Zn-SOD, que está localizada no espaço intermembranar e Mn-SOD, localizada na matriz mitocondrial. O H_2O_2 pode ser metabolizado por um sistema antioxidante (glutationa peroxidase/reductase; catalase; tioredoxina) localizado na matriz mitocondrial. Caso não seja metabolizado, o peróxido de hidrogênio pode reagir com metais de transição, como por exemplo, o Fe^{2+} . A partir dessa reação, é formado o radical hidroxila (OH^{\cdot}), molécula altamente reativa com biomoléculas, que pode resultar na oxidação de lipídeos, do DNA e modificações pós-traducionais. Modificado de Kowaltowski et al., 2009.

1.4. A via de reparo por excisão de bases (*Base Excision Repair*, BER)

As lesões formadas em DNA por EROs são, em sua maioria, reparadas pela via de reparo por excisão de bases (BER, do inglês *Base Excision Repair*) (Figura 3) (Souza-Pinto et al., 2008). A via BER é conservada evolutivamente, com alto grau de

homologia de sequência e funcional, o que demonstra sua grande importância biológica para a manutenção da integridade do genoma. Além disso, o *knockout* de qualquer enzima dessa via, com exceção das glicosilases, as quais possuem redundância funcional, é letal no estágio embrionário ou peri-natal em camundongos, demonstrando que a ausência de BER é incompatível com a vida (Wilson e Bohr, 2007). A via BER é iniciada por enzimas chamadas DNA glicosilases, que reconhecem e excisam a base modificada pela hidrólise da ligação *N*- β -glicosídica entre a base e o açúcar. Existem várias DNA glicosilases, com diferente especificidade de substrato, porém com alguma sobreposição nos possíveis substratos reconhecidos. Em eucariotos, a oxoguanina DNA glicosilase (OGG1) é a principal enzima que reconhece e cliva 8-oxoGua, mas também excisa outras bases oxidadas como 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina (FapyGua) e 8-oxo-7,8-dihidroadenina (8-oxoAde) (Dizdaroglu et al., 2008).

As DNA glicosilases podem gerar dois produtos distintos, sítio abásico ou quebra de fita simples, dependendo da enzima possuir ou não uma atividade AP-liase associada (McCullough et al., 2001). Quando o produto gerado é o sítio abásico, esse é substrato da próxima enzima da via, a AP-endonuclease 1 (APE1), que cliva esse intermediário gerando uma quebra de fita simples. As quebras produzidas na etapa anterior são substrato para a enzima seguinte, a DNA polimerase β (Pol β), a qual adiciona um novo nucleotídeo e “limpa” o terminal 5', hidrolisando a desoxirribose fosfato que foi formada pela ação enzimática de APE1. Essa atividade restaura um terminal 5' ligável (5'-fosfato), o qual se torna um substrato para a DNA ligase III, finalizando o reparo da lesão. Essa sub-via de BER é conhecida como *short-patch* BER, uma vez que apenas um novo nucleotídeo foi adicionado à fita de DNA reparada.

Sob determinadas condições, tais como estresse oxidativo, o terminal 5' gerado após a incisão do sítio abásico pode ser um produto resistente à atividade desoxirribose fosfatase da Pol β , como um fosfoglicolato. Dessa forma, a polimerase introduz entre 3-6 novos nucleotídeos, deslocando a fita complementar nesse processo. Essa fita deslocada (*flap*) é substrato para uma endonuclease estrutura-específica,

denominada Flap endonuclease I (FEN1), responsável por remover o *flap* e gerar os terminais ligáveis, os quais serão ligados pelas DNA ligases III ou IV. Essa sub-via é conhecida como *long-patch* BER. Os mecanismos moleculares que determinam se um evento de reparo irá seguir por uma ou outra sub-via ainda são desconhecidos. Entretanto, o estudo desenvolvido por Klungland e Lindahl (1997) mostrou que o intermediário 5'-dRP produzido pela atividade de AP endonuclease tem um papel determinante na "escolha" de se a via seguirá pelo *short-patch* ou *long-patch*. Caso esse intermediário seja processado pela atividade de dRP liase da Pol β , a via BER prossegue pela *short-patch*. Por outro lado, se não houver a remoção do resíduo dRP pela Pol β , segue-se com a sub-via *long-patch*. Além disso, outro estudo mostrou que a concentração de ATP próxima ao sítio abásico é determinante para prosseguir por uma das sub-vias. Quando a concentração de ATP é baixa, BER progride com a sub-via *long-patch*. Já quando a concentração de ATP é alta, a sub-via preferencial é a *short-patch* (Petermann et al., 2003).

É importante ressaltar que todas as reações enzimáticas que compõem a via BER são sequenciais, em que o produto de uma enzima é imediatamente passado como substrato da seguinte. Esse modelo, conhecido como "*passing of the baton*" enfatiza como um desequilíbrio entre essas atividades poderia levar ao acúmulo de intermediários tóxicos (Wilson e Kunkel, 2000).

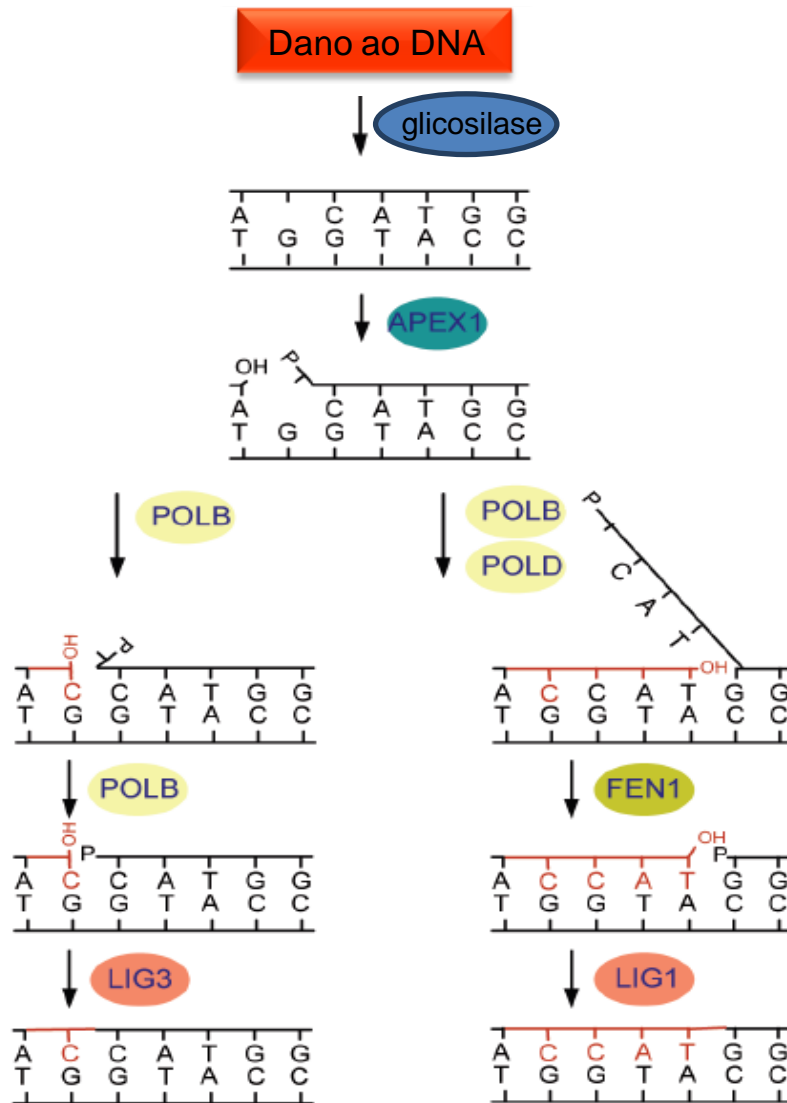


Figura 3: Via de Reparo por Excisão de Bases (BER). A via BER inicia com o reconhecimento da base lesionada por uma enzima denominada DNA glicosilase. Existem mais de 10 DNA glicosilases sendo que cada uma é específica no reconhecimento de um tipo de lesão. Essa enzima excisa a base por meio da hidrólise da ligação N- β -glicosídica, formando um sítio abásico. Esse sítio, por sua vez, é reconhecido e clivado pela enzima AP endonuclease 1 ou pela atividade de AP-liase, que algumas DNA glicosilases possuem. Com a incisão do sítio abásico, a natureza das extremidades 5' e 3' definirá qual das duas subvias, *short-patch* ou *long-patch*, será seguida. No *short patch*, apenas um nucleotídeo será adicionado pela DNA polimerase e, posteriormente, as extremidades são ligadas pela DNA ligase. No *long patch*, a DNA polimerase adiciona 2 a 8 nucleotídeos formando uma alça suspensa que é reconhecida e excisada pela enzima *Flap* endonuclease. Após a remoção da alça suspensa, a fita é selada pela DNA ligase. Adaptada de Robertson et al., 2009.

1.5. A via BER e a DA

O tecido cerebral mantém alta atividade metabólica oxidativa basal para suprir a grande demanda energética resultante de suas atividades fisiológicas. Essa característica pode levar a um aumento na produção de EROs pelas células nervosas que, se não for contrabalanceado pelo sistema antioxidante endógeno, resultaria em um desequilíbrio no estado redox celular (revisado em Canugovi et al., 2013). Em decorrência, poderia se especular que mecanismos que removam ou reparem danos oxidativos deveriam ser funcionalmente mais relevantes em cérebro do que em outros tecidos com baixo metabolismo oxidativo. Essa hipótese foi testada em um estudo no qual se comparou a atividade das DNA glicosilases UDG, NTH1, OGG1 em seis tecidos distintos de ratos. Os resultados demonstraram que a atividade de BER varia significativamente entre os diferentes tecidos. O cérebro, apesar de ser um tecido pós-mitótico, apresentou níveis de atividades de UDG superiores ao observado no fígado. Entretanto, a atividade da glicosilase OGG1 apresentou-se baixa, o que levou os autores a conclusão de que essa redução contribui para a suscetibilidade do cérebro ao acúmulo de lesões oxidadas. (Karahalil et al., 2002).

Em um modelo murino de envelhecimento normal, verificou-se um declínio das atividades das DNA glicosilases OGG1, UDG e NTH1 com a idade em cinco diferentes regiões cerebrais. Nos extratos mitocondriais, as três DNA glicosilases apresentaram redução da sua atividade associada com a idade em todas as regiões analisadas, enquanto que nos extratos nucleares a redução das atividades enzimáticas ocorreu apenas no cerebelo. Com isso, a deficiência no reparo do DNAm_t pode desempenhar um papel significativo no processo de envelhecimento, bem como contribuir para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas relacionadas ao envelhecimento, como a DA (Imam et al., 2006).

Estudos iniciais relacionando a atividade de BER com a DA encontraram uma redução da atividade de OGG1 em frações nucleares do hipocampo, do giro parahipocampal, do lóbulo parietal inferior e do giro temporal superior e médio nos indivíduos com a demência quando comparados ao grupo controle (Lovell et al., 2000).

Além disso, foi verificada uma redução da expressão da OGG1 mitocondrial em diferentes regiões cerebrais de indivíduos com DA, sendo significativa no córtex entorrinal e no giro orbitofrontal (Iida et al., 2002).

Desta forma, Weissman et al. (2007) hipotetizaram que a redução da atividade de BER em células de regiões afetadas do cérebro dos pacientes com DA contribui para o acúmulo das lesões oxidadas e para o efeito tóxico das mesmas, com consequente morte neuronal. Em contrapartida, células de regiões não afetadas não apresentariam alterações nas atividades de BER, estando, portanto, protegidas dos efeitos citotóxicos das lesões. Para testar essa hipótese, o estudo utilizou amostras obtidas de lóbulo parietal (região afetada) e do cerebelo (região controle) de encéfalos de pacientes DA e de indivíduos normais, da mesma faixa etária. Os autores observaram diminuições significativas na atividade e nível de expressão de duas enzimas de BER, uracil DNA glicosilase (UDG) e Pol β nos extratos celulares totais das duas regiões. Além disso, a atividade de BER nos extratos apresentou uma correlação inversa com o estágio Braak-Braak. Como as alterações na atividade de reparo não foram restritas à região afetada do cérebro, os resultados sugeriram que a baixa atividade de BER pode funcionar como um fator de risco ao desenvolvimento de DA, de tal maneira que indivíduos com outros fatores de risco para desenvolvimento de DA, como placas neuríticas e emaranhados neurofibrilares, entretanto com alta atividade de BER, estariam relativamente protegidos da progressão da doença.

Esse estudo analisou os extratos celulares totais das regiões cerebrais dos indivíduos acometidos pela DA, sendo que a fisiopatologia da doença está diretamente envolvida com disfunções mitocondriais, associada ao acúmulo preferencial de lesões oxidadas no DNA mitocondrial (Lovell e Markesbery, 2007). Estudos avaliando a atividade da via BER especificamente em extratos mitocondriais não foram realizados até o momento, tornando a presente pesquisa de suma importância para compreender os mecanismos moleculares envolvidos na doença de Alzheimer.

2. Objetivos

OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo é determinar se alterações em atividades de reparo por excisão de bases em mitocôndrias de encéfalos humanos estão associadas ao desenvolvimento de DA.

2.1. OBJETIVO ESPECÍFICO

Medir as atividades das enzimas UDG (uracil DNA glicosilase), APE1 (endonuclease de sítios abásicos) e OGG1 (oxoguanina DNA glicosilase) em extratos mitocondriais do córtex temporal e cerebelo dos indivíduos pertencentes aos grupos experimentais e comparar essas atividades com indicadores de progressão da doença.

3. Materiais e Métodos

3.1. Grupos Experimentais

Foram utilizados três grupos experimentais: 1) controles, cognitivamente normais e sem indicação neuropatológica de DA; 2) DA assintomático, com cognição normal, mas com indicação neuropatológica; e 3) DA sintomático. Os grupos foram normalizados por idade e classificados como descrito na Tabela 1. As amostras foram obtidas do Banco de Encéfalos Humanos do Grupo de Estudos em Envelhecimento Cerebral da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (BEHGEEC).

Os critérios de inclusão dos indivíduos nos três grupos estão descritos em Grinberg et al. (2007). Todas as amostras foram obtidas mediante consentimento livre e esclarecido por escrito, aprovado pela CAPPESQ – FMUSP sob o número 285 (vide anexo), assinado por responsável.

A avaliação cognitiva combinou dois instrumentos: *Informant Questionnaire on Cognitive Decline in the Elderly* - IQCODE - versão retrospectiva (Jorm e Jacomb, 1989), o qual avalia as alterações cognitivas apresentadas pelo indivíduo ao longo de dez anos, em comparação com o período de três meses anteriores ao óbito; e Escore Clínico de Demência – *Clinical Dementia Rating* (CDR) – (Morris, 1993), que classifica a atividade cognitiva em 4 níveis (0 a 3) e cobre a intersecção entre a funcionalidade e os aspectos cognitivos. Estes critérios foram baseados nos estudos de Morris et al. (1991) e Isella et al. (2006).

O exame neuropatológico seguiu os critérios do *National Institute on Aging and Reagan Institute* (NIA-RI). As placas neuríticas foram caracterizadas como proposto pelo CERAD (Morris et al., 1988), o qual é classificado em 4 níveis (0, A, B e C). A distribuição e quantidade dos emaranhados neurofibrilares foi classificada segundo os critérios propostos por Braak e Braak (Braak e Braak, 1991), o qual é dividido em seis diferentes estágios (I a VI).

Segundo os critérios de correlação clínicos e neuropatológicos, os casos foram classificados em três grupos diferentes para a análise, como demonstrado na Tabela 1:

TABELA 1. Classificação dos grupos por meio da correlação dos parâmetros clínicos e patológicos

Grupos	CDR	IQCODE	CERAD	Braak e Braak	Número de Indivíduos
Controle	0	<3,20	0 ou A	≤ III	6
Demência de Alzheimer assintomático	0	< 3,20	B ou C	≥ IV	7
Demência de Alzheimer	≥ 2	> 3,80	B ou C	≥ IV	7

3.2. Isolamento das frações mitocondriais das amostras congeladas

As frações mitocondriais foram isoladas de cerca de 1 g de tecido congelado de córtex temporal e cerebelo de indivíduos dos três grupos.

As frações foram obtidas por meio de centrifugação diferencial, seguida de purificação em gradiente de Ficoll, como descrito em Karahalil et al. (2002). Para isso, as amostras foram suspensas em tampão MSHE contendo 0,21 M manitol, 70 mM sacarose, 10 mM HEPES-KOH (pH 7.4), 1 mM EGTA, 2 mM EDTA, 0,15 mM espermina, 0,75 mM espermidina. Antes do uso do tampão, foram adicionados *cocktail* de inibidor de protease (Roche) e 5 mM DTT. Os tecidos foram homogeneizados em homogenizador tipo Potter com 20-30 passagens do pistão. Após esse processo, o homogeneizado foi incubado por 30 minutos no gelo para promover a lise celular. Em seguida, o material foi centrifugado a 1.200 g, 12 min, 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e centrifugado novamente nas mesmas condições anteriores com a finalidade de aumentar a pureza da fração mitocondrial. Posteriormente, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e centrifugado a 10.000 g, 15 min, 4°C. Após esta centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado suspenso em 3% Ficoll 400 (em MSHE), e depositado sobre uma coluna de 6% Ficoll 400 (em MSHE), e centrifugados a 10.500 g, 30 min, 4°C. O *pellet* mitocondrial foi ressuspensionado em 300 µL de MSHE e incubado no gelo com 0,1% de digitonina por 15 min para promover liberação de mitocôndrias presas em sinaptossomos. Após a

incubação, a suspensão mitocondrial foi centrifugada a 9.000 g, 10 min, 4°C e lavada em 1 mL de MSHE. Essa centrifugação foi repetida mais uma vez com a finalidade de eliminar o detergente utilizado na etapa anterior. Em seguida, o *pellet* mitocondrial foi ressuspenso em pequeno volume de tampão MSHE e armazenado em freezer -80°C.

3.3. Verificação da pureza das frações mitocondriais

Com a finalidade de verificar a pureza das frações mitocondriais dos encéfalos humanos, foi realizada a separação das proteínas por SDS-PAGE e posterior análise por *Western Blotting*, como descrito abaixo.

3.3.1. Separação de proteínas por SDS - Page

Os extratos proteicos foram separados através de eletroforese em gel de poliacrilamida. O gel de empacotamento continha acrilamida: bis-acrilamida (29:1) 4%; Tris-HCl 125 mM pH 6,8; SDS 0,1%; persulfato de amônio 0,1%; 1,7 µL/mL de TEMED, e o gel de separação continha acrilamida: bis-acrilamida (29:1) 12,5%; Tris-HCl 375 mM pH 8,8; SDS 0,1%; persulfato de amônio 0,1%; 1 µL/mL de TEMED. Os extratos proteicos, diluídos em tampão de amostra (Tris-HCl 40 mM pH 6,8; glicerol 8%, SDS 2%; DTT 100 mM; azul de bromofenol 0,1%) foram incubados a 95°C por 5 minutos e aplicados no gel. Este foi submetido à voltagem de 125 V em tampão de corrida Tris-glicina (Tris-HCl 25 mM pH 8,3; glicina 250 mM; SDS 0,1%) por cerca de 2 horas, até que a frente de corrida atingisse o terço final do gel.

3.3.2. Western Blotting

Após separação das proteínas por SDS-PAGE, as mesmas foram transferidas para membrana de PVDF (polivinidileno difluoreto, GE Healthcare) em tampão de transferência gelado (25 mM Tris-HCl pH 8,3; 192 mM glicina; 20% metanol). Essa transferência foi feita com uma corrente constante de 200 mA por um período de 3 horas. Após a transferência, sítios de ligação proteica inespecíficos foram bloqueados por 1 hora em 10 mL de solução contendo 5% de BSA (*bovine serum albumin*) em

tampão TBS-T (10 mM Tris-HCl pH 7,6; 150 mM NaCl; Tween 0,05%) sob leve agitação a 25°C. Transcorrido esse tempo, a membrana foi incubada com o anticorpo primário por 12 horas em uma solução de TBS-T contendo 1% de BSA sob agitação leve a 4°C. Nesse trabalho, foram usados os seguintes anticorpos primários: anti-Lamina B2 (X223) (sc-56147, *mouse*, diluição 1:500); anti-PCNA (sc-25280, *mouse*, diluição 1:500) e anti-COX-4 (20E8) (sc-58348, *mouse*, diluição 1:750), todos obtidos da Santa Cruz Biotechnology (Texas, EUA). Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana foi submetida a três lavagens, sendo que a primeira foi de 5 minutos, a segunda foi de 10 minutos e a terceira de 15 minutos em TBS-T. Em seguida, a membrana foi transferida para uma solução contendo o anticorpo secundário diluído 1:5000 em solução de TBS-T com 1% de BSA por 2 horas com agitação leve. O anticorpo secundário conjugado com HRP (*horse radish peroxidase*) foi anti-*mouse* IgG (sc - 2047). O excesso de anticorpo secundário foi retirado da membrana por meio de três lavagens de 15 minutos. Para a revelação, foi utilizado o *ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare), o qual se baseia na quimioluminescência produzida pela reação de oxidação do luminol pela HRP, na presença de peróxido, em meio alcalino. O sinal obtido foi visualizado por exposição de filme de raios-X. Para quantificação, os autoradiogramas foram escaneados e a intensidade das bandas foi analisada utilizando o programa *ImageJ* (NIH, USA, software aberto).

3.4. Preparação dos extratos mitocondriais

Os extratos mitocondriais foram preparados a partir das frações obtidas durante o fracionamento celular descrito acima. Para isso, as amostras foram suspensas em tampão contendo 20 mM Hepes-KOH (pH 7.0), 150 mM KCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100 (Promega), e *cocktail* de inibidor de protease (Roche), e incubadas por 1 h a 4°C, sob agitação. Ao fim da incubação, as amostras foram centrifugadas a 50.000 g por 1 h a 4°C, os sobrenadantes foram coletados, adicionado glicerol até a concentração final ficar em 10% e armazenados a -80°C. A concentração

de proteínas nos extratos foi determinada pelo método de *Bradford* (BioRad, EUA), usando BGG (2 mg/mL) como padrão.

3.5. Medidas das atividades de BER

As atividades de enzimas componentes da via BER foram avaliadas utilizando ensaios *in vitro*, com substratos específicos para cada passo enzimático. Os substratos consistem de oligonucleotídeos com 30 pares de base que contém um único sítio modificado, específico para cada enzima. Os substratos foram sintetizados pela *Midland Certified Reagent Company Inc.* (Midland, TX, USA). Desta forma, oligonucleotídeos contendo 8-oxoGua são utilizados para medir a atividade da DNA glicosilase específica para essa lesão, a enzima OGG1. Similarmente, oligonucleotídeos contendo desoxi-uracil e sítio abásico no meio da sequência, são usados para medir as atividades de UDG e APE1, respectivamente. Nesses ensaios, os substratos foram marcados fluorimetricamente, e a atividade de incisão foi determinada por mudanças nos padrões de migração dos produtos em gel desnaturante de poliacrilamida. As sequências dos substratos utilizados nesse estudo estão apresentadas na Tabela 2, sendo que as modificações relevantes estão assinaladas em negrito.

TABELA 2: Sequência dos substratos usados neste estudo

Ensaio	Oligo	Sequência
Incisão - OGG1	OG	5'-ATA TAC CGC G(OG)C CGG CCG ATC AAG CTT ATT 3'-TAT ATG GCG CC G GCC GGC TAG TTC GAA TAA
Incisão - UDG	UU	5'-ATA TAC CGC GG(U) CGG CCG ATC AAG CTT ATT 3'-TAT ATG GCG CC G GCC GGC TAG TTC GAA TAA
Incisão - AP	AP	5'-ATA TAC CGC GG(F) CGG CCG ATC AAG CTT ATT 3'-TAT ATG GCG CC G GCC GGC TAG TTC GAA TAA
Controle	C-lod	5'-ATA TAC CGC GGC CGG CCG ATC AAG CTT ATT 3'-TAT ATG GCG CCG GCC GGC TAG TTC GAA TAA

Legenda: OG: 8-oxoGua; U: uracil; F: tetrahydrofurano, análogo de sítio abásico

3.5.1. Marcação fluorescente dos oligonucleotídeos para os ensaios *in vitro*

Para os ensaios de incisão, os oligonucleotídeos (UU com 109 pmol/μl e AP com 110,4 pmol/μl) foram marcados fluorimetricamente na extremidade 3' utilizando 100 μM de Alexa Fluor® 647-aha-dCTP (A32771 – Molecular Probes) e Desoxinucleotidil terminal transferase (TdT) (New England Biolabs), conforme as condições recomendadas pelo fabricante. Posteriormente, foram submetidos à eletroforese em gel desnaturante (Acrilamida 23%, Uréia 7M, em tampão TBE - 0,22 M Tris; 0,18 M de ácido bórico; 5 mM de EDTA; pH 8,3) por 3 h com potência constante de 15 W, com a finalidade de separar os oligonucleotídeos marcados dos nucleotídeos livres não incorporados.

Após a eletroforese, a região do gel contendo os oligonucleotídeos marcados foi identificada por meio de luz UV indireta, cortada do gel, macerada e incubada com tampão de extração de oligonucleotídeos (0,1% SDS; 0,5 M acetato de amônio e 10 mM acetato de magnésio) a 37°C por 12 horas. A suspensão obtida foi submetida a três centrifugações de 20.000 g, 15 minutos, a 25°C com recuperação do sobrenadante, ao qual foi adicionado 500 μL de etanol 100% gelado e armazenado em freezer -20°C por 12 horas. Após esse período, a solução foi centrifugada a 20.000 g, 4°C por 30 minutos. O *pellet* foi ressuscitado em 500 μL de etanol 70% gelado, centrifugado a 20.000 g, 15 minutos, 4°C e posteriormente, ressuscitado em água e submetido a uma eletroforese em gel desnaturante para quantificação da concentração dos oligonucleotídeos marcados, utilizando como padrão o oligonucleotídeo controle que foi marcado de modo semelhante, mas sem passar pelo processo de purificação. Após a quantificação, os substratos foram incubados com a fita complementar (sem modificações) e 100 mM KCl por 5 min a 95°C, seguido de esfriamento gradual para promover a formação de DNA de fita dupla (duplex).

3.5.2. Ensaio de incisão de oligonucleotídeos

Os ensaios de incisão foram realizados como descrito em Weissman et al. (2007). As condições de reação para cada substrato estão descritas abaixo, sendo que todas as reações são iniciadas pela adição de 50 fmoles de substrato:

- a) OG: 40 mM HEPES–KOH (pH 7.4), 5 mM EDTA, 1 mM DTT, 75 mM KCl, 10% glicerol e 10-50 µg de extrato. As reações são incubadas a 32°C por 6 h.
- b) UU: 70 mM HEPES–KOH (pH 7.4), 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 75 mM KCl, 10% glicerol e 5 µg de extrato. As reações são incubadas a 37°C por 1 h.
- c) APE1: 25 mM HEPES–KOH (pH 7.4), 25 mM KCl, 0.1 mg/ml BSA, 5 mM MgCl₂, 10% glicerol, 0,05% Triton X-100 e 25 ng de extrato. As reações são incubadas a 37°C por 15 min.

As reações de OG foram finalizadas pela adição de 0,25 mg/ml Proteinase K e 0,5% SDS seguida de incubação a 55°C por 15 min. Posteriormente, os substratos e produtos foram precipitados por 12 horas a -20°C após adição de 2 µg de glicogênio, 500 mM acetato de amônio e etanol 70%. Os precipitados foram coletados por centrifugação, secos e suspensos em tampão de amostra (95% formamida Hi-Di, 5 mM EDTA). No ensaio UU, após o término da reação, foram adicionados 50 mM de NaOH, seguido de incubação a 75°C por 15 minutos e de suspensão em tampão de amostra. Uma vez que a enzima UDG não apresenta atividade AP-liase, essa incubação garante que sítios abásicos não hidrolisados por APE1, contida no extrato, sejam convertidos a quebras de fita, que podem ser detectadas no ensaio. No ensaio APE1, após o período de incubação, as amostras foram submetidas a aquecimento de 90°C por 10 minutos, com a finalidade de interromper a reação enzimática, e o tampão de amostra foi adicionado. Todas as amostras foram desnaturadas por 5 min a 80°C e resolvidas, sob condições desnaturantes, em 23% acrilamida/ 7 M Uréia, em tampão TBE, a 15 W por 2 h. Os géis foram revelados em scanner de imagens *Typhoon TRIO* (GE Healthcare) e quantificados usando o software *ImageQuant* (GE Healthcare).

3.6. Medida da atividade da enzima Citrato Sintase

A enzima citrato sintase catalisa a condensação de oxaloacetato a acetil-coenzima A e água, formando citrato mais CoA-SH. O ensaio para a atividade dessa enzima mede a formação de TNB (ácido tionitrobenzóico) mais CoA-S-S-TNB, à partir da reação da CoA-SH gerada pela reação catalisada pela citrato sintase de oxaloacetato com DTNB (ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico)).

Esse ensaio enzimático foi adaptado à microplaca para espectro visível com base nos protocolos da empresa *Oroboros® Instruments* (Oroboros, 2010). Para a realização desse ensaio, foram utilizados 1,5 µg das frações mitocondriais em tampão MSHE em cada poço. Foram adicionados os seguintes reagentes: Tris-HCl 0,1 M (pH 7,1), oxaloacetato 250 µM, DNTB 100 µM e acetil-coenzima A 50 µM. Durante 5 minutos, a absorbância foi monitorada em 412 nm, a 30 °C, e foi calculada a inclinação do branco e das amostras por minuto.

Em seguida, utilizando-se o coeficiente de absorvidade molar para o TNB ($13,6 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$), foram efetuados os cálculos até que se obtivesse o valor da atividade enzimática em mU/mL, fazendo a correção para o caminho óptico referente ao volume de 0,2 mL, utilizado nesse ensaio. Após a dosagem de proteína pelo método de *Bradford*, os dados foram normalizados em relação à quantidade de proteína adicionada ao ensaio e a atividade final foi apresentada em mU/mg de proteína (nmoles/min/mg proteína).

3.7. Análises estatísticas

Os resultados estão apresentados como sendo a média dos valores \pm desvio padrão da média. As diferenças entre os resultados obtidos foram analisadas utilizando o teste *t-Student* não pareado. Os dados referentes à idade dos indivíduos foram submetidos ao teste ANOVA e os referentes à escolaridade, ao teste não-paramétrico Kruskal-Wallis.

As figuras apresentam resultados de dois experimentos independentes realizados em duplicata. Nas análises dos ensaios enzimáticos, o indivíduo número 1

do grupo DA foi considerado *outlier* e por isso foi excluído da análise estatística. Foi considerado $p < 0,05$ como diferença significativa.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando os softwares *Prisma* *GraphPad* versão 5.01 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA) ou *SigmaStat* versão 3.5 (Systat Software, Chicago, IL, EUA).

4. Resultados



4.1. Caracterização dos grupos experimentais

Os dados demográficos, clínicos e patológicos dos indivíduos dos grupos experimentais utilizados neste estudo estão apresentados na Tabela 3. Com a finalidade de minimizar a contribuição de diferenças decorrentes de degradação do material biológico nas atividades enzimáticas encontradas, somente foram incluídas no estudo amostras com intervalo *post-mortem* inferior a 24 horas.

Foram selecionados seis indivíduos nos três grupos do estudo, sendo que três são do sexo feminino e três do sexo masculino. O grupo controle apresenta idade média de $80,17 \pm 5,64$ e escolaridade média de $4,00 \pm 2,53$, enquanto que o grupo DA possui idade média de $79,50 \pm 3,93$ e escolaridade média de $3,50 \pm 2,51$. Já o grupo DA assintomático apresenta idade média de $80,83 \pm 4,62$ e escolaridade média de $7,33 \pm 5,35$. A partir desses dados, observa-se que o grupo com DA assintomático apresenta escolaridade média superior aos outros dois grupos, visto que esse grupo possui dois indivíduos com os maiores níveis educacionais (12 e 15 anos de estudo), o que pode ter contribuído para o aumento da média da escolaridade.

Os dados referentes à idade foram submetidos ao teste ANOVA, uma vez que apresentaram distribuição normal ($p > 0,05$ no teste Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variâncias ($p > 0,05$ no teste de Levene). Com isso, obteve-se $p > 0,05$ com o teste ANOVA ($p = 0,89$), indicando que não há diferença significativa entre os grupos no critério da idade. Quanto à escolaridade, os dados foram submetidos ao teste estatístico não-paramétrico Kruskal-Wallis, visto que não apresentaram homogeneidade de variâncias ($p = 0,05$ no teste de Levene), sendo o valor da probabilidade igual a $p = 0,32$. Logo, nos dois casos os valores de p são superiores a 0,05, o que evidencia a ausência de diferença significativa entre os grupos.

Além disso, o grupo de DA assintomático possui três indivíduos com demência mista, ou seja, a presença de dois ou mais tipos de demências na análise anatomopatológica. Esse fato pode complicar a análise dos dados e interpretação dos resultados, uma vez que não se tratam de casos puros de DA assintomático.

Entretanto, a dificuldade em coletar e classificar casos desse grupo justificou a inclusão de todos os casos no estudo. Vale a pena ressaltar, além disso, que esses três indivíduos podem representar um grupo de amostras importante para o estudo, uma vez que a cognição está preservada, mesmo perante a existência de mais de um fator de lesão neuronal.

TABELA 3: Dados demográficos, clínicos e patológicos dos grupos experimentais

Grupo Experimental	Sujeito	Idade	Gênero	Escolaridade (anos)	Braak	IQ	CDR	CERAD	IPM	Anatomopatológico
CONTROLE	1	79	M	4	0	3	0	A	14:23	Normal
	2	80	M	4	2	3	0	0	15:56	Normal
	3	84	F	4	1	3	0	0	11:43	Normal
	4	89	F	8	2	3	0	0	5:31	Normal
	5	75	M	4	2	3	0	A	17:03	Normal
	6	74	F	0	2	3	0	A	16:17	Normal
	Mean ± SD	80,17 ± 5,64			4,00 ± 2,53					
DOENÇA DE ALZHEIMER	1	82	M	2	6	5	3	C	15:20	DA
	2	80	M	4	5	4,73	3	C	18:36	DA
	3	83	F	2	6	4,92	3	B	12:03	DA
	5	72	M	8	6	4,46	2	C	07:47	DA
	6	81	F	1	4	5	3	B	13:40	DA
	7	79	F	4	6	5	3	C	16:00	DA
	Mean ± SD	79,50 ± 3,93			3,50 ± 2,51					
DOENÇA DE ALZHEIMER ASSINTOMÁTICO	1	82	M	1	4	3	0	B	22:55	DA
	3	87	F	12	5	3,04	0	C	08:40	DA + DaV
	4	83	F	8	4	3	0	B	20:40	DA + DP
	5	73	M	15	4	3	0	C	08:10	DA
	6	80	F	4	5	3	0	C	13:35	DA + DaV
	7	80	M	4	5	3	0	C	09:25	DA
	Mean ± SD	80,83 ± 4,62			7,33 ± 5,35					

Legenda: IQ = Informant Questionnaire on Cognitive Decline in the Elderly; CDR = Clinical Dementia Rating; IPM = Intervalo post-mortem (em horas); DA = Doença de Alzheimer; DP = Doença de Parkinson; DaV = Demência vascular cerebral

4.2. Análise da pureza das frações mitocondriais

4.2.1. Análise da pureza em cerebelo

Como o estudo visa medir a atividade das enzimas da via de reparo por excisão de bases em mitocôndrias, é necessário verificar se as frações mitocondriais das amostras humanas utilizadas não apresentam contaminação nuclear, visto que esta organela também possui as mesmas enzimas da via BER. Desta forma, a contaminação das amostras mitocondriais com proteínas nucleares pode interferir significativamente nos resultados dos ensaios. Para isso, foi realizado *Western Blotting* com seis amostras dos grupos controle e DA assintomático e com sete amostras do grupo DA. Os marcadores proteicos utilizados foram: Lamina B2 e PCNA, proteínas nucleares com peso molecular respectivos de 65 KDa e 36KDa; e COX IV, proteína mitocondrial com peso molecular de 17 KDa.

Como pode ser observado na figura 4 (painel A), as frações mitocondriais obtidas dos indivíduos 1 e 2 do grupo controle (**C1** e **C2**) não apresentam quantidades significativas do marcador nuclear, indicando ausência de contaminação nuclear nessas amostras. Já nas frações mitocondriais dos indivíduos com DA e com DA assintomático, observamos que as amostras **D2** e **As2** estão livres de contaminação nuclear. Entretanto, foi observada a presença de contaminação nas frações das amostras **D1** e **As1**, indicado pela presença da banda correspondente a Lamina B2. Para a normalização dos resultados, foram consideradas contaminadas amostras que apresentam razão volumétrica de Lamina e COX IV comparadas com a razão do controle nuclear maior do que 10%.

As frações que apresentaram contaminação nuclear foram submetidas a duas lavagens com tampão MSHE e posterior centrifugação de 9.000g por 10 minutos a 4°C, visando assim, a recuperação de mitocôndrias puras. Entretanto, como pode ser visualizada no painel B da figura 4, a amostra **D1** ainda apresenta quantidade significativa de contaminação nuclear, o que inviabilizou sua utilização nos ensaios. Já a amostra **As1**, apesar de ainda apresentar sinal de Lamina B2 acima dos níveis considerados aceitáveis (15,94% de razão relativa ao controle nuclear), foi utilizada

uma vez que trata de uma amostra rara e importante para a análise do grupo DA assintomático.

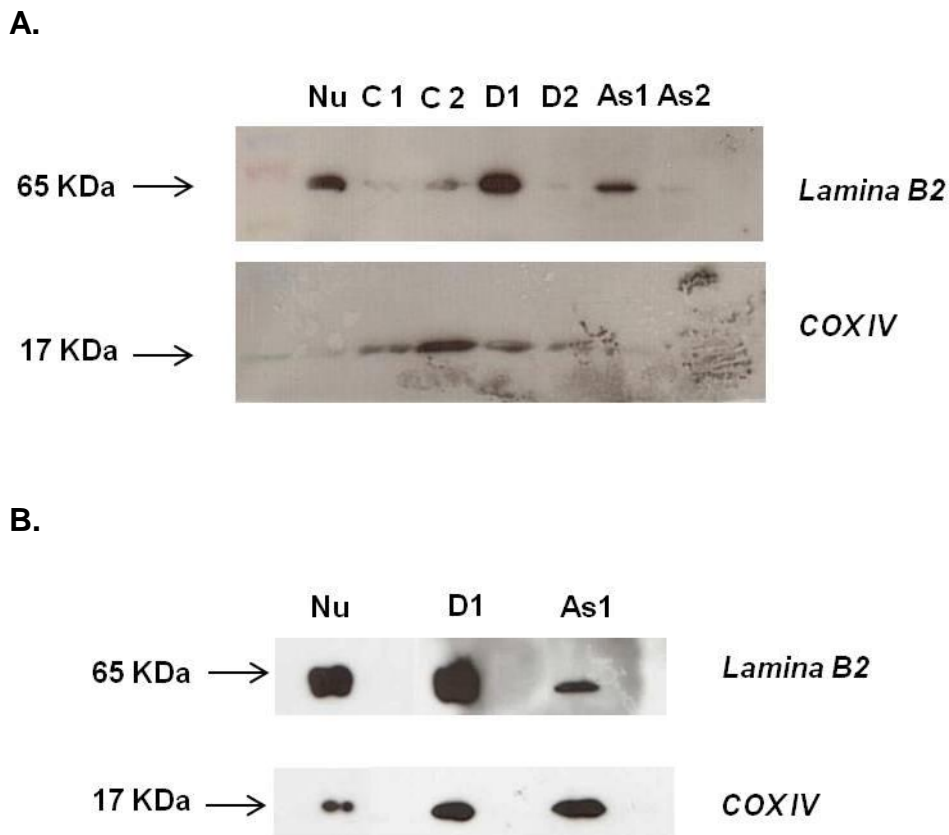


Figura 4. Análise da pureza das frações mitocondriais de cerebelo humano dos grupos experimentais por meio de imunodeteção de Lamina B2 (65 KDa) como marcador nuclear e COX IV (17 KDa) como marcador mitocondrial. Para cada amostra, foram utilizados 20 µg de proteína. A pureza das frações foi analisada por meio da ausência de marcação de Lamina B2. **A** – Verificação de presença de contaminação nuclear nos indivíduos **D1** e **As1**. **Nu** – Fração nuclear de cerebelo humano de exclusão (controle positivo); **C 1** – Fração mitocondrial do indivíduo número 1 do grupo controle; **C 2** – Fração mitocondrial do indivíduo 2 do grupo controle; **D1** – Fração mitocondrial do indivíduo 1 do grupo com DA; **D2** - Fração mitocondrial do indivíduo 2 do grupo com DA; **As1** - Fração mitocondrial do indivíduo 1 do grupo com DA assintomático; **As2** – fração mitocondrial do indivíduo 2 do grupo com DA assintomático. **B** - Análise da pureza das frações mitocondriais das amostras que estavam contaminadas com conteúdo nuclear e que foram submetidas a duas lavagens com tampão MSHE com a finalidade de retirar a contaminação. **Nu** – fração nuclear de cerebelo humano de exclusão (controle positivo); **D1** – fração mitocondrial do indivíduo número 1 do grupo com DA submetido a duas lavagens adicionais; **As1** – fração mitocondrial do indivíduo 1 do grupo com DA assintomático submetido a duas lavagens.

A figura 5 apresenta os resultados do *Western Blotting* das frações mitocondriais correspondentes aos indivíduos 3 e 4 de cada grupo experimental. Como podem ser observadas, todas as amostras, com exceção da amostra **C4**, possuem contaminação nuclear, como identificado pela imunodeteção do marcador nuclear PCNA. Entretanto, a porcentagem relativa de contaminação em relação ao controle nuclear (controle positivo) é considerada pequena, visto que os valores foram inferiores a 5 %, sendo, portanto, considerados aceitáveis (Tabela 4).

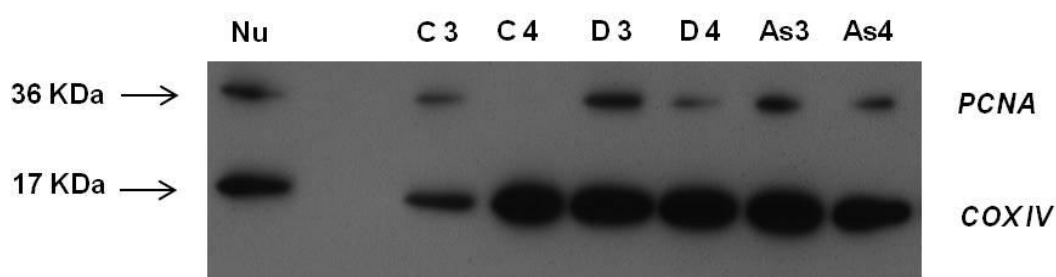


Figura 5. Análise da pureza das frações mitocondriais de cerebelo humano dos grupos experimentais por meio de imunodeteção de PCNA (36 KDa) como marcador nuclear e COX IV (17 KDa) como marcador mitocondrial. Para cada amostra, foram utilizados 20 µg de proteína. A pureza das frações foi analisada por meio da ausência de marcação de PCNA. Verificação de presença de contaminação nuclear nas amostras mitocondriais. **Nu** – Fração nuclear de cerebelo humano de exclusão (controle positivo); **C3** – Fração mitocondrial do indivíduo número 3 do grupo controle; **C4** – Fração mitocondrial do indivíduo 4 do grupo controle; **D3** – Fração mitocondrial do indivíduo 3 do grupo com DA; **D4** - Fração mitocondrial do indivíduo 4 do grupo com DA; **As3** - Fração mitocondrial do indivíduo 3 do grupo com DA assintomático; **As4** – Fração mitocondrial do indivíduo 4 do grupo com DA assintomático.

TABELA 4: Porcentagem de contaminação nuclear nas frações mitocondriais de cerebelo

Amostras	Porcentagem relativa de contaminação nuclear
Ctrl 1	3,62
Ctrl 2	6,69
Ctrl 3	2,38
Ctrl 4	1,76
DA 1	31,29
DA 2	1,64
DA 3	2,32
DA 4	2,21
Ass 1	15,94
Ass 2	0
Ass 3	2,18
Ass 4	0,68

Legenda: A porcentagem relativa de contaminação nuclear foi calculada por meio da razão volumétrica entre os anticorpos Lamina e COX IV (amostras 1 e 2) ou PCNA e COXIV (amostras 3 e 4) em relação ao controle nuclear

A figura 6 apresenta os resultados da análise dos indivíduos 5 e 6 de cada grupo experimental. Como pode ser observado na figura, o grupo DA apresenta quatro indivíduos e não dois como os grupos controle e DA assintomático. Como a amostra **D1** da figura 4 apresentou contaminação nuclear relativamente alta (31,29%), foi solicitado mais material de cerebelo desse indivíduo que foi submetido ao processo de isolamento e imunodeteccção de Lamina B2 e COX IV. Além disso, acrescentou-se a amostra **D7**

ao processo de isolamento mitocondrial, uma vez que o indivíduo **D4** apresenta CDR igual a 1, sendo que o parâmetro de inclusão nesse grupo seria de CDR igual a 2 ou 3.

Nesse conjunto de amostras, a quantificação da contaminação nuclear presente em cinco das oito amostras não foi calculada devido à saturação do sinal de COX IV, observada em todas as amostras da figura. Entretanto, do ponto de vista qualitativo, nota-se que o sinal de Lamina B2 das frações mitocondriais é muitas vezes inferior ao da fração nuclear, o que viabiliza o uso dessas amostras nos ensaios enzimáticos. Deve-se levar em consideração a dificuldade de obtenção de amostras dessa natureza, bem como a quantidade reduzida de material que foi concedida para a realização dos ensaios enzimáticos propostos. Por isso, não foi possível realizar repetições desse *Western blotting*.

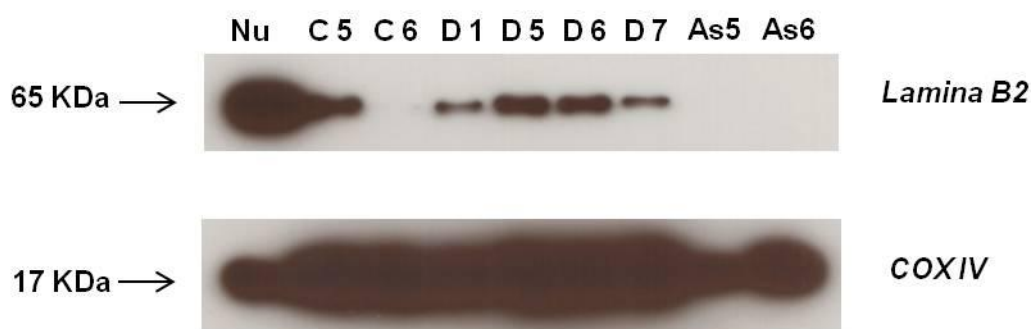


Figura 6. Análise da pureza das frações mitocondriais de cerebelo humano dos grupos experimentais por meio de imunodeteção de Lamina B2 (65 KDa) como marcador nuclear e COX IV (17 KDa) como marcador mitocondrial. Para cada amostra, foram utilizados 10 µg de proteína. A pureza das frações foi analisada por meio da ausência de marcação de Lamina B2. **A** – Verificação de presença de contaminação nuclear nos indivíduos **C5, D1, D5, D6 e D7**. **Nu** – Fração nuclear de cerebelo humano de exclusão (controle positivo); **C5** – Fração mitocondrial do indivíduo número 5 do grupo controle; **C6** – Fração mitocondrial do indivíduo 6 do grupo controle; **D1** – Fração mitocondrial do indivíduo 1 do grupo com DA; **D5** - Fração mitocondrial do indivíduo 5 do grupo com DA; **D6** - Fração mitocondrial do indivíduo 6 do grupo com DA; **D7** - Fração mitocondrial do indivíduo 7 do grupo com DA; **As5** - Fração mitocondrial do indivíduo 5 do grupo com DA assintomático; **As6** – fração mitocondrial do indivíduo 6 do grupo com DA assintomático.

4.2.2. Análise da pureza em córtex temporal

Como descrito acima, a análise da pureza das frações mitocondriais é de suma importância para verificar se as atividades de BER observadas no ensaio *in vitro* são específicas das mitocôndrias isoladas, sem a interferência da atividade das proteínas nucleares. Assim, foi realizada a mesma análise de *Western Blotting* para as frações mitocondriais obtidas de córtex temporal.

Com a finalidade de reduzir a contaminação nuclear que foi observada nas amostras de cerebelo, o protocolo de isolamento das frações mitocondriais foi alterado. As duas primeiras centrifugações de 1.200g foram reduzidas para 1.000g, mantendo-se as mesmas condições de temperatura e de tempo. Após essas duas etapas, foi adicionada uma centrifugação de 800g por 10 minutos a 4°C dos sobrenadantes obtidos da primeira etapa de centrifugação diferencial para precipitar possíveis contaminações nucleares ainda presentes.

Como pode ser observado nas figuras 7 e 8, as frações mitocondriais do córtex temporal de cada grupo experimental não apresentaram contaminação nuclear, uma vez que a banda referente ao marcador Lamina B2 não foi detectada nas amostras.

A.



B.

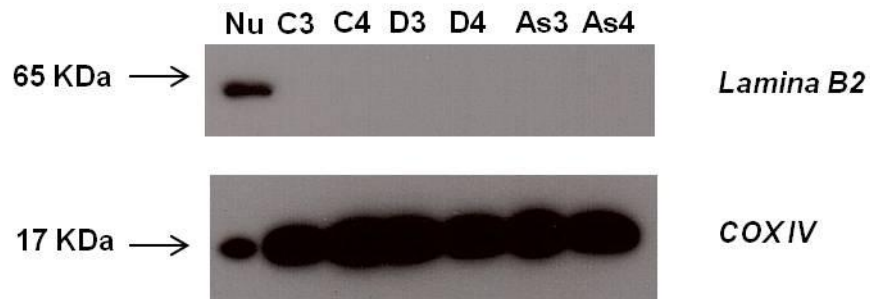


Figura 7. Análise da pureza das frações mitocondriais de córtex temporal humano dos grupos experimentais por meio de imunodeteção de Lamina B2 (65 KDa) como marcador nuclear e COX IV (17 KDa) como marcador mitocondrial. Para cada amostra, foram utilizados 10 µg de proteína. A pureza das frações foi analisada por meio da ausência de marcação de Lamina B2. **A** - Verificação da ausência de contaminação nuclear nos indivíduos 1 e 2 dos grupos experimentais. **Nu** – Fração nuclear de cerebelo humano de exclusão (controle positivo); **C1** – Fração mitocondrial de córtex temporal do indivíduo número 1 do grupo controle; **C2** – Fração mitocondrial do córtex temporal do indivíduo 2 do grupo controle; **D1** – Fração mitocondrial do córtex temporal do indivíduo 1 do grupo com DA; **D2** - Fração mitocondrial do córtex temporal do indivíduo 2 do grupo com DA; **As1** - Fração mitocondrial do córtex temporal do indivíduo 1 do grupo com DA assintomático; **As2** – fração mitocondrial do córtex temporal do indivíduo 2 do grupo com DA assintomático. **B** – Verificação de frações mitocondriais de córtex temporal dos indivíduos 3 e 4 dos grupos experimentais livres da contaminação nuclear. **Nu** – Fração nuclear de cerebelo humano de exclusão (controle positivo); **C3** – Fração mitocondrial de córtex temporal do indivíduo número 3 do grupo controle; **C4** – Fração mitocondrial do córtex temporal do indivíduo 4 do grupo controle; **D3** – Fração mitocondrial do córtex temporal do indivíduo 3 do grupo com DA; **D4** - Fração mitocondrial do córtex temporal do indivíduo 4 do grupo com DA; **As3** - Fração mitocondrial do córtex temporal do indivíduo 3 do grupo com DA assintomático; **As4** – Fração mitocondrial do córtex temporal do indivíduo 4 do grupo com DA assintomático.

Na figura 8, foram acrescentadas amostras de córtex temporal e cerebelo do indivíduo assintomático número 7 (**As7**), que foi incluído no estudo *a posteriori* uma vez que o indivíduo **As2** apresentou CERAD igual a 0, sendo que para ser classificado como assintomático deveria possuir esse parâmetro igual a B ou C.

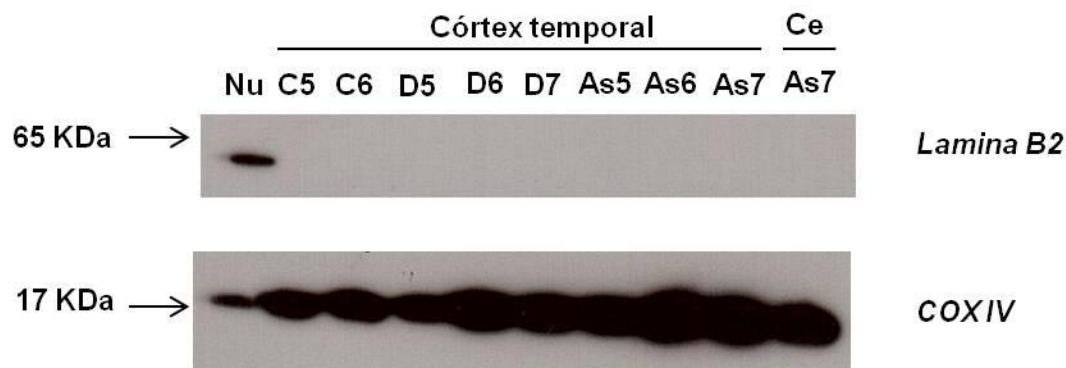


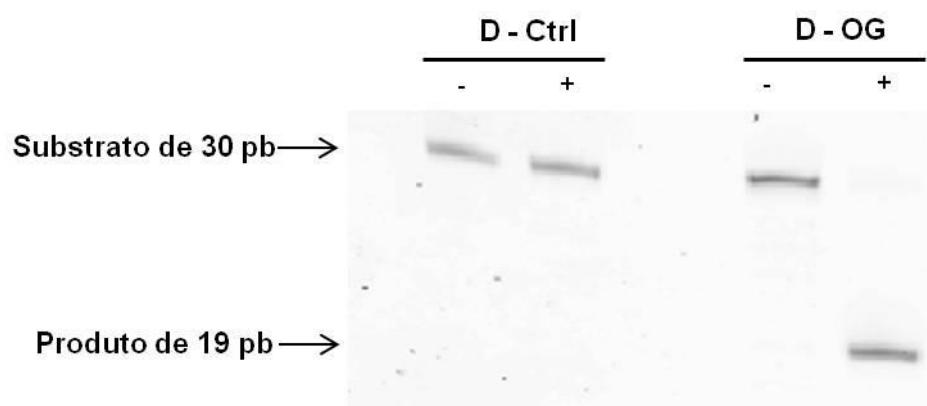
Figura 8. Análise da pureza das frações mitocondriais de córtex temporal dos grupos experimentais e de uma amostra de cerebelo por meio de imunodeteção de Lamina B2 (65 KDa) como marcador nuclear e COX IV (17 KDa) como marcador mitocondrial. Para cada amostra, foram utilizados 10 µg de proteína. A pureza das frações foi analisada por meio da ausência de marcação de Lamina B2. Verificação da ausência de contaminação nuclear nos indivíduos dos grupos experimentais. **Nu** – Fração nuclear de cerebelo humano de exclusão (controle positivo); **C5** – Fração mitocondrial de córtex temporal do indivíduo número 5 do grupo controle; **C6** – Fração mitocondrial do córtex temporal do indivíduo 6 do grupo controle; **D5** – Fração mitocondrial do córtex temporal do indivíduo 5 do grupo com DA; **D6** - Fração mitocondrial do córtex temporal do indivíduo 6 do grupo com DA; **D7** - Fração mitocondrial do córtex temporal do indivíduo 7 do grupo com DA; **As5** - Fração mitocondrial do córtex temporal do indivíduo 5 do grupo com DA assintomático; **As6** – Fração mitocondrial do córtex temporal do indivíduo 6 do grupo com DA assintomático; **As7** – Fração mitocondrial do indivíduo 7 do grupo com DA assintomático. **Ce** - cerebelo.

4.3. Preparo e verificação dos substratos para os ensaios enzimáticos

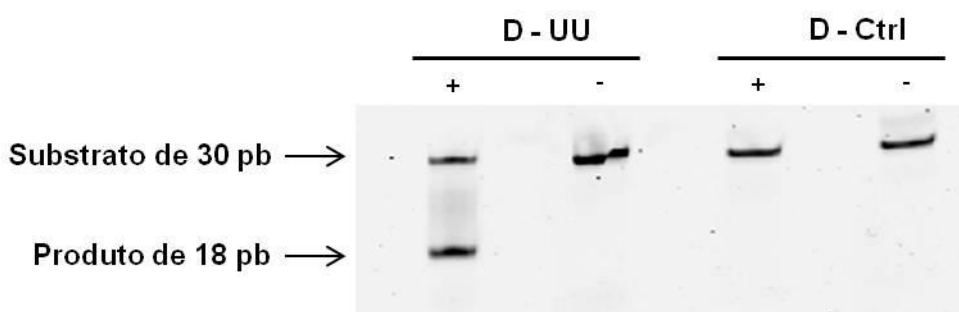
Os substratos das reações enzimáticas consistem em oligonucleotídeos sintéticos com lesões únicas em sítios específicos como, por exemplo, a presença de desoxi-uracila na posição 12 da sequência. Com a finalidade de verificar se os produtos obtidos nos ensaios *in vitro* são provenientes do reconhecimento e da excisão desses sítios pelas DNA glicosilases, foram utilizadas enzimas comerciais para a padronização dos ensaios. No painel A da figura 9, observa-se que o duplex OG apresenta a modificação 8-oxoGua na posição esperada, uma vez que a incubação do substrato com a enzima Formamidopirimidina DNA glicosilase (Fpg) recombinante resultou na formação de um produto de incisão com o tamanho esperado, de 19 pares de bases (pb). Do mesmo modo, no painel B da mesma figura verifica-se a presença de uracila

no duplex UU, visto que a incubação com uracil DNA glicosilase (UDG) resultou no produto esperado, de 18 pares de bases. No painel C, observa-se que a incubação do substrato AP com a enzima comercial AP-endonuclease (APE1) resultou na formação de um produto de 18 pb, confirmando a presença do sítio abásico na posição 12 do oligonucleotídeo. Assim, os oligonucleotídeos sintetizados contêm as modificações específicas desejadas, e estão adequados para a realização dos ensaios de incisão da via BER.

A.



B.



C.

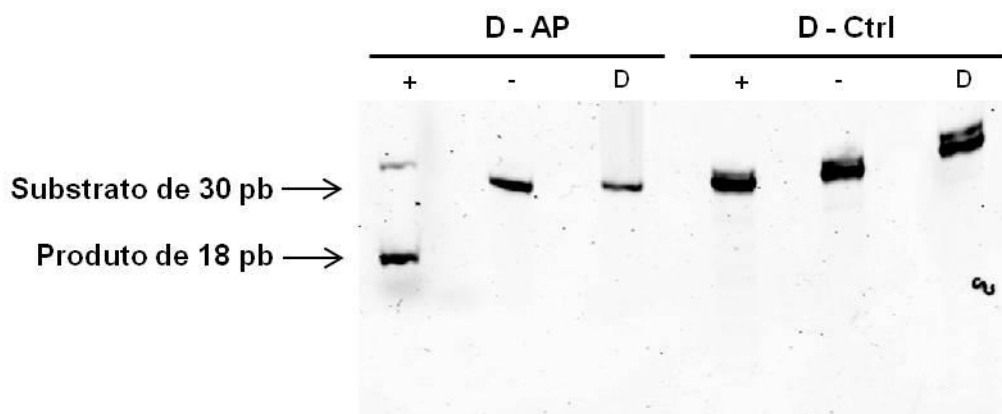


Figura 9. Verificação da presença dos sítios modificados nos substratos marcados por meio de reações com enzimas comerciais (New England BioLabs). Foram utilizados 25 fmoles do duplex controle (sem lesão), OG (com a base modificada 8-oxoGua), UU (com a base uracila) e AP (com sítio abásico). A presença da base modificada é determinada pela formação de um produto, sendo que na reação com oxoguanina DNA glicosilase (Fpg) o produto tem 19 pares de bases (pb) e nas reações com uracil DNA glicosilase (UDG) e AP-endonuclease (APE1) tem 18 pb. **A** – Verificação da presença de 8-oxoGua por meio da ocorrência de incisão utilizando reações padrões com 2 unidades da enzima Fpg. **D - Ctrl⁻** - Duplex controle na ausência da enzima comercial; **D - Ctrl⁺** - Duplex controle na presença da enzima comercial; **D - OG⁻** - Duplex OG na ausência de Fpg; **D - OG⁺** - Duplex OG na presença de Fpg. **B** – Verificação da presença de uracila por meio da ocorrência de incisão utilizando reações padrões com 1 unidade da enzima UDG. **D - UU⁻** - Duplex UU na ausência de UDG; **D - UU⁺** - Duplex UU na presença de UDG. **C** – Verificação da presença de sítio abásico por meio da ocorrência de incisão utilizando reações padrões com 1 unidade da enzima APE1. **D - AP⁺** - Duplex AP na presença de APE1; **D - AP⁻** - Duplex AP na ausência de APE1; **D** – duplex na ausência de enzima.

4.4. Ensaio da atividade de AP endonuclease (APE1)

4.4.1. Medida da atividade de APE1 em cerebelo de indivíduos com critérios de exclusão

Várias enzimas da via BER possuem atividade endonucleolítica para sítios abásicos, como a atividade AP-liase de glicosilases do tipo II. Entretanto, o substrato sintético utilizado nos ensaios descritos aqui contém um tetrahydrofurano, um análogo reduzido de um sítio abásico natural gerado pela atividade de DNA glicosilases, que é resistente à atividade AP-liase. Desta forma, a incisão deste substrato deve ser atribuída, com grande probabilidade a AP-endonucleases clássicas, que reconhecem ambos os substratos. Como a principal atividade de endonuclease identificada em mitocôndrias humanas tem sido atribuída a APE1 (Chattopadhyay et al., 2006), passamos, a partir de agora, a designar a atividade de incisão de substratos contendo tetrahydrofurano como atividade de APE1.

Os ensaios das atividades enzimáticas da via BER foram realizados segundo Weissman et al. (2007). Como foram utilizados oligonucleotídeos marcados fluorimetricamente e não marcados radioativamente, como descrito naquele trabalho, realizou-se a padronização das condições do ensaio a fim de se obter resultados em condições experimentais nas quais as reações estão acontecendo na fase linear das curvas de atividade versus concentração de extrato e tempo de incubação.

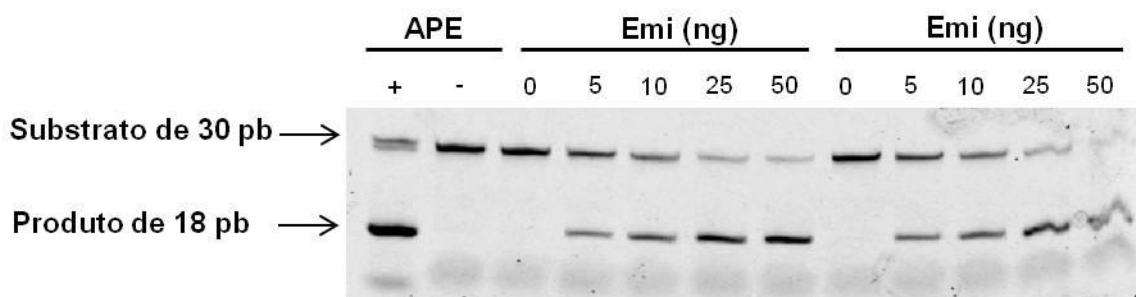
Nos ensaios com os extratos proteicos, utilizaram-se 50 fmoles de substrato, ao invés dos 25 fmoles utilizados nos ensaios com enzimas recombinantes (Figura 9) com a finalidade de aumentar a intensidade das bandas correspondentes aos substratos e produtos no gel, para que fosse possível detectar atividades enzimáticas baixas (menos do que 10%) que resultariam em bandas de produtos de fraca intensidade. Ao comparar a figura 9 com a figura 10, nota-se que essa modificação aprimorou a qualidade da imagem adquirida, visto que as bandas da figura 10 são mais intensas.

A figura 10 apresenta os resultados da medida da atividade da AP endonuclease 1 (APE1) *in vitro*, realizado em duplicata. Foram utilizados extratos

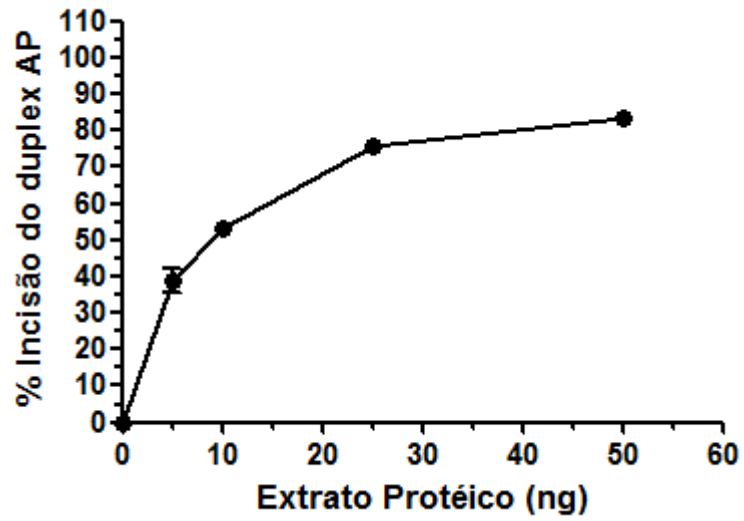
mitocondriais de cerebelo humano de indivíduos que não preenchem os critérios de inclusão, sendo assim, classificados como material de exclusão. Como visualizado no painel B da figura 10, a utilização de 10 ng de extrato resultou em aproximadamente 50% de incisão do substrato, o que está localizado na faixa linear da curva de atividade. O painel A apresenta um gel típico deste ensaio, em que o produto da incisão por 10 ng de extrato pode ser visualizado e quantificado eficientemente. Desta forma, utilizou-se esta concentração proteica para a realização dos ensaios posteriores.

Além disso, realizou-se a padronização do tempo de incubação da reação a 37°C, utilizando a concentração proteica escolhida. O painel D da mesma figura mostra que 10 minutos de incubação resultam em uma atividade de incisão superior a 40% e localizada na reta ascendente do gráfico da cinética enzimática. O produto formado a partir do reconhecimento e incisão do sítio AP pode ser visualizado e quantificado eficientemente nestas condições (painel C da figura 10).

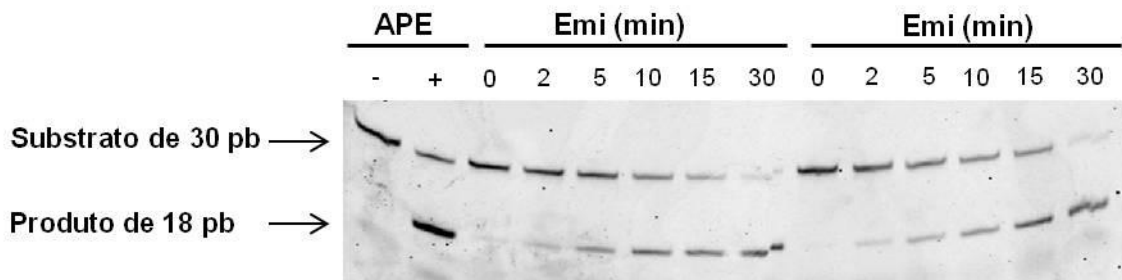
A.



B.



C.



D.

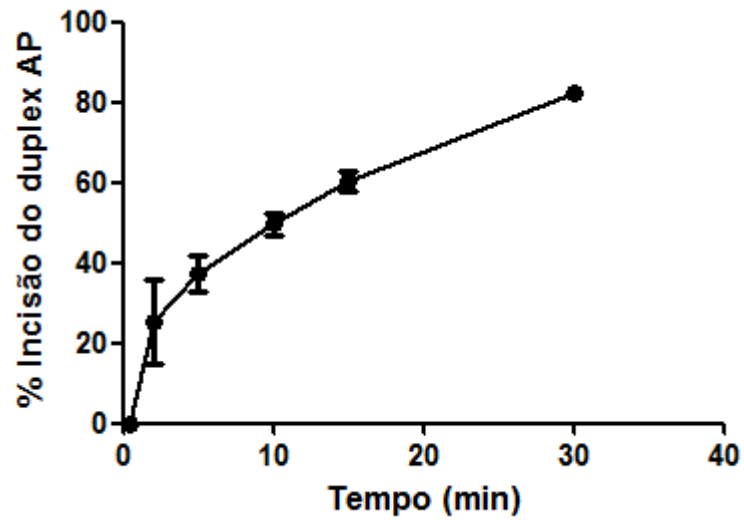
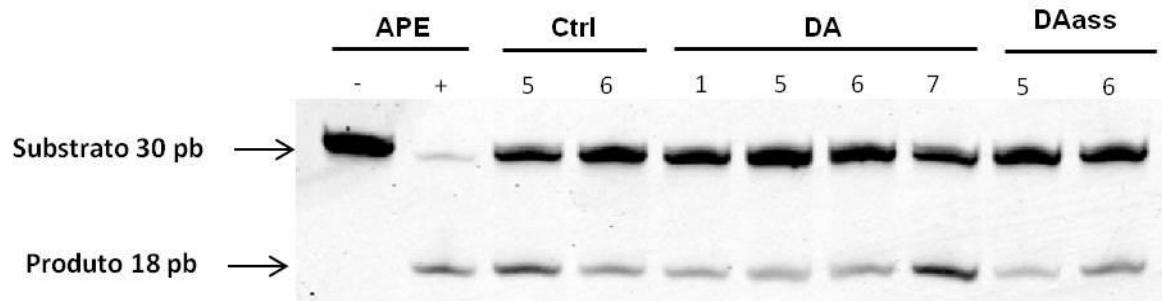


Figura 10. Determinação da atividade de APE1 *in vitro* em função da concentração de extrato mitocondrial e do tempo de incubação com amostras de cerebelo humano. Para cada reação, foram utilizados 50 fmoles do duplex AP (oligonucleotídeo com o sítio abásico). **A** - Verificação da ocorrência de incisão, em gel desnaturante, com diferentes concentrações do extrato mitocondrial de cerebelo humano. Os substratos foram incubados por 10 minutos a 37°C com as seguintes concentrações de proteínas: 0 ng, 5 ng, 10 ng, 25 ng e 50 ng. **APE1⁻** – duplex AP sem extrato e na ausência da enzima comercial; **APE1⁺** – duplex AP na presença da enzima comercial. **B** - Gráfico da atividade de incisão da enzima APE1 em diferentes concentrações de extrato mitocondrial de cerebelo humano. Este gráfico apresenta a média de um ensaio realizado em duplicata. **C** - Verificação da ocorrência de incisão, em gel desnaturante, com 10 ng de extrato mitocondrial de cerebelo humano em diferentes períodos de tempo. Os substratos foram incubados a 37°C nos seguintes períodos de tempo: 0, 2, 5, 10, 15, 30 minutos. **D** - Gráfico da atividade de incisão da enzima APE1 em diferentes períodos de tempo. Este gráfico apresenta a média de um ensaio realizado em duplicata.

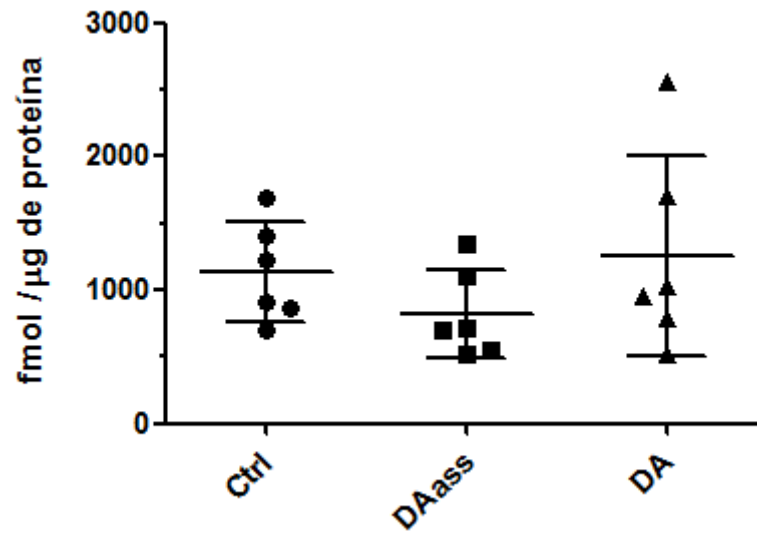
4.4.2. Análise da atividade de APE1 em cerebelo dos grupos experimentais

As condições estabelecidas no ensaio APE1 utilizando cerebelo humano de exclusão foram utilizadas para a medida da atividade de APE1 nas amostras obtidas dos indivíduos dos grupos do estudo. O painel B da figura 11 apresenta um gráfico de dispersão com as médias da atividade de incisão do duplex AP por µg de proteína de cada grupo, bem como a média de cada indivíduo. Nesse painel, a porcentagem de incisão não está normalizada com a atividade de citrato sintase (CS). O painel A apresenta um gel típico do ensaio, no qual é possível visualizar a formação do produto de incisão das reações com as amostras de cada indivíduo. O painel C da mesma figura apresenta os valores da atividade de APE1 normalizados pela atividade de citrato sintase de cada amostra, que normaliza pelo conteúdo mitocondrial relativo de cada extrato proteico. A análise dos dados obtidos indica que a média da atividade APE1 do grupo DA assintomático é significativamente superior ao dos outros grupos. Isso se deve ao fato de os extratos mitocondriais obtidos deste grupo apresentarem um conteúdo mitocondrial relativo menor (menor atividade de CS) quando comparado com os outros dois grupos, como pode ser visualizado no painel D.

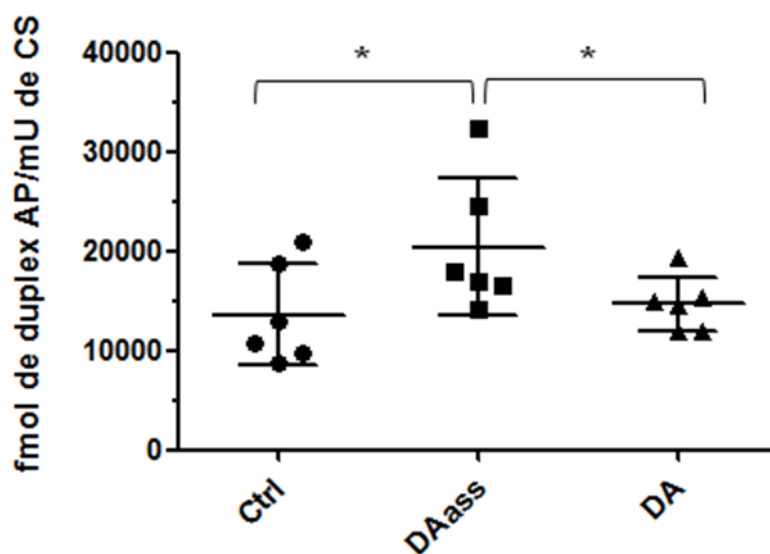
A.



B.



C.



D.

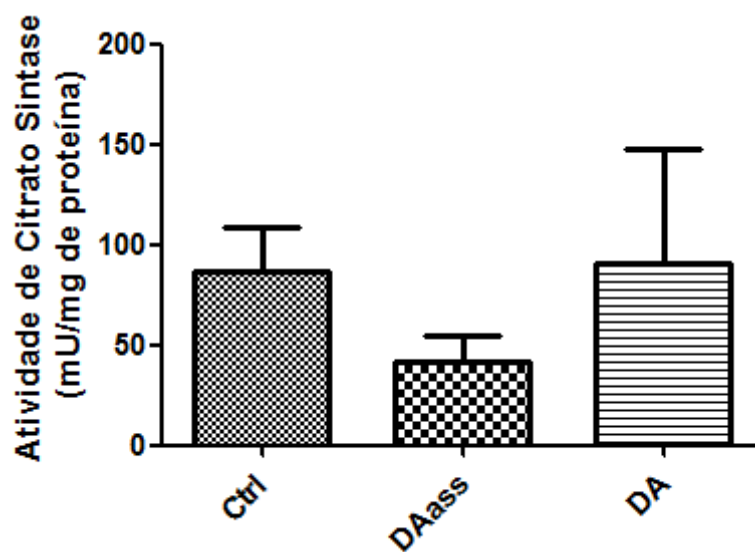


Figura 11. Medida da atividade de AP endonuclease em extratos mitocondriais de cerebelo humano dos grupos experimentais. Para cada reação, foram utilizados 50 fmoles do duplex AP (oligonucleotídeo com o sítio abásico). **A** - Verificação da ocorrência de incisão do duplex AP, em gel desnaturante, por meio da incubação com os extratos mitocondriais dos indivíduos pertencentes aos grupos experimentais. Os substratos foram incubados por 10 minutos a 37°C com 10 ng de proteína. **APE1⁻** – duplex AP sem extrato e na ausência da enzima comercial; **APE1⁺**

– duplex AP na presença da enzima comercial; **Ctrl** – grupo controle; **DA** – grupo dos indivíduos com a doença de Alzheimer; **DAass** – grupo dos indivíduos com DA assintomático. Os números correspondem aos indivíduos que estão classificados na tabela 3. **B** - Gráfico da atividade de incisão da enzima APE1 em cerebelo humano dos três grupos do estudo sem a normalização com a atividade de citrato sintase. Este gráfico apresenta a média \pm desvio padrão de dois ensaios realizados em duplicata. **C** – Gráfico da atividade de incisão da enzima APE1 em cerebelo humano normalizado com a atividade de citrato sintase. Este gráfico apresenta a média \pm desvio padrão de dois ensaios independentes para cada amostra, realizados em duplicata. **D** – Gráfico da média da atividade de citrato sintase por mg de proteína dos indivíduos dos grupos experimentais. * (asterisco) – $p < 0,05$.

4.4.3. Medida da atividade de APE1 em córtex temporal de indivíduos com critérios de exclusão

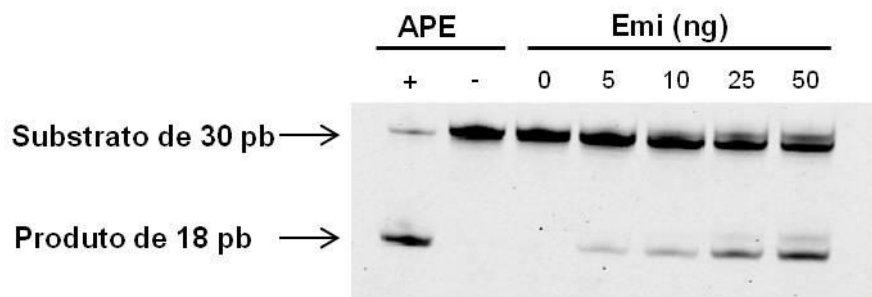
As condições do ensaio de AP endonuclease *in vitro* em córtex temporal de indivíduos com critérios de exclusão foram estabelecidos conforme descrito anteriormente para o cerebelo.

A figura 12 apresenta os resultados das medidas da atividade enzimática em relação à concentração de extrato mitocondrial, bem como em função do tempo de incubação a temperatura de 37°C. Como pode ser observada no painel B, a utilização de uma concentração de extrato de 10 ng resulta em uma taxa de incisão inferior a 10%, o que prejudicaria a visualização do produto e sua quantificação. Já a concentração de 25 ng resultou em uma taxa de incisão superior a 15% e localizada na fase linear da curva de cinética enzimática. Por isso, a concentração escolhida para os ensaios com córtex temporal foi de 25 ng. Este resultado demonstra a existência de diferenças significativas em atividades de reparo entre regiões distintas do cérebro, como já observado para amostras murinas (Imam et al., 2006). O painel A da mesma figura apresenta um gel desnaturante típico, em que pode ser observada a formação do produto nas diferentes concentrações de extrato mitocondrial utilizada. O tempo de incubação dessa reação enzimática a 37°C foi de 10 minutos, conforme o ensaio realizado para o cerebelo.

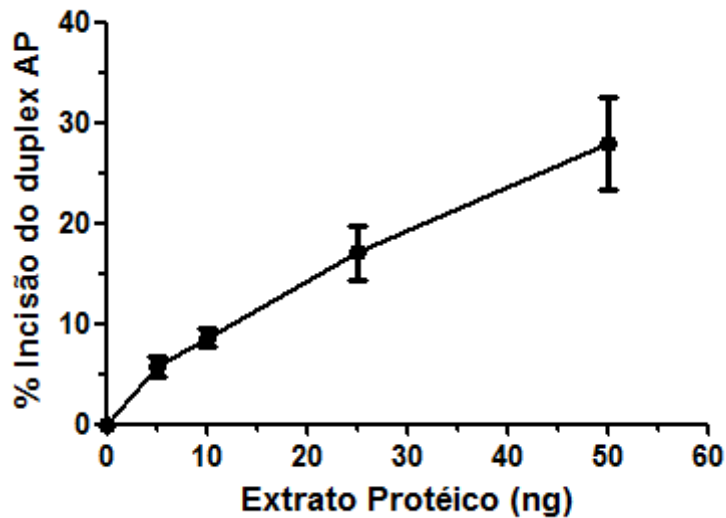
Com a finalidade de se estabelecer o tempo de incubação ideal para o ensaio de APE1 nessas amostras, realizou-se um ensaio da taxa de incisão do duplex AP com 25 ng de extrato mitocondrial de córtex temporal de exclusão em diferentes

tempos de incubação a temperatura de 37°C. Conforme o gráfico do painel D, o tempo ideal de incubação para realizar os ensaios foi de 15 minutos, visto que a atividade de incisão é superior a 15% e está localizada na fase linear da curva. O painel C apresenta um gel típico mostrando a incisão do duplex AP na presença de 25 ng de extrato mitocondrial de córtex temporal humano em diferentes períodos de incubação a 37°C.

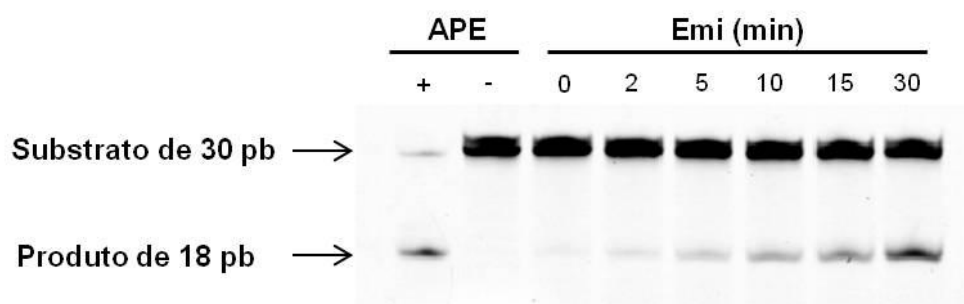
A.



B.



C.



D.

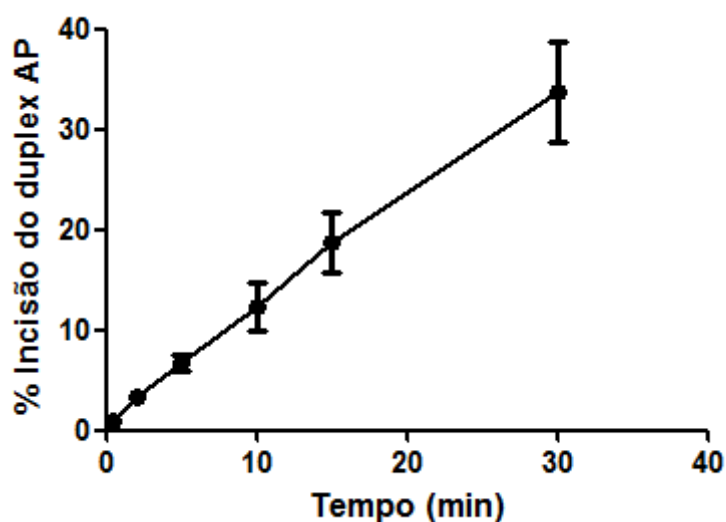


Figura 12. Determinação da atividade de APE1 *in vitro* em função da concentração de extrato mitocondrial e do tempo de incubação com amostras de córtex temporal humano. Para cada reação, foram utilizados 50 fmoles do duplex AP. **A** - Verificação da ocorrência de incisão, em gel desnaturante, com diferentes concentrações do extrato mitocondrial de córtex temporal humano. Os substratos foram incubados por 10 minutos a 37°C com as seguintes concentrações de proteínas: 0 ng, 5 ng, 10 ng, 25 ng e 50 ng. **APE1⁻** – duplex AP sem extrato e na ausência da enzima comercial; **APE1⁺** – duplex AP na presença da enzima comercial. **B** - Gráfico da atividade de incisão da enzima APE1 em diferentes concentrações de extrato mitocondrial de córtex temporal humano. Este gráfico apresenta a média \pm desvio padrão de dois ensaios realizados em duplicata. **C** - Verificação da ocorrência de incisão, em gel desnaturante, com 25 ng de extrato mitocondrial de córtex temporal humano em diferentes períodos de tempo. Os substratos foram incubados a 37°C nos seguintes períodos de tempo: 0, 2, 5, 10, 15, 30 minutos. **D** -

Gráfico da atividade de incisão da enzima APE1 em diferentes períodos de tempo. Este gráfico apresenta a média \pm desvio padrão de dois ensaios realizados em duplicata.

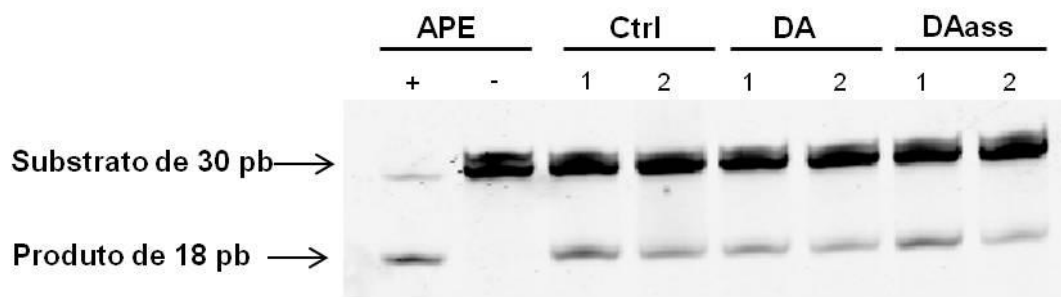
4.4.4. Análise da atividade de APE1 em córtex temporal dos grupos experimentais

As condições do ensaio da atividade de AP endonuclease estabelecidas para o córtex temporal foram utilizadas para medir a atividade de APE1 nos indivíduos dos grupos experimentais, como pode ser visualizada na figura 13. O painel A da figura apresenta um gel típico do ensaio APE1 realizado com 25 ng de extrato mitocondrial com dois indivíduos de cada grupo experimental, incubados por 15 minutos à temperatura de 37°C.

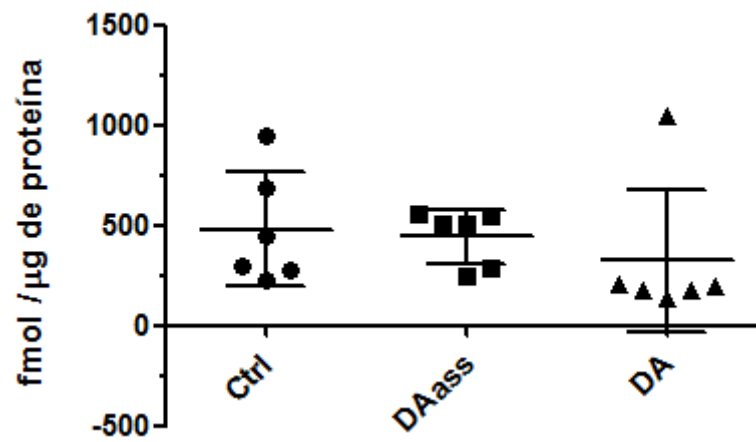
No painel B da figura, está apresentada a média de incisão do duplex AP por μ g de proteína de cada grupo, bem como a média de cada indivíduo. Nesse gráfico, os valores não foram normalizados pela atividade de CS, mostrando que as médias da taxa de incisão dos três grupos são equivalentes, não havendo diferenças entre eles.

Como as médias das atividades de citrato sintase dos três grupos são equivalentes (painel D da figura 13), pode-se afirmar que as atividades de APE1 entre os grupos não apresentam diferenças significativas (painel C da figura 13) quando normalizadas pela CS. Entretanto, observa-se que o grupo DA apresenta um indivíduo com atividade de APE1, normalizada por CS ou não, muito mais alta do que os outros indivíduos do grupo, que se concentram em uma mesma faixa de atividade. É possível, portanto, que esse indivíduo apresente a atividade de APE1 aumentada por alguma variação polimórfica ou de expressão, independente do desenvolvimento da patologia. Se esse indivíduo fosse desconsiderado, a atividade média de APE1 em córtex temporal do grupo DA seria significativamente menor do que dos grupos controle e DA assintomático. Desta forma, o número de indivíduos de cada grupo experimental está sendo aumentado, para justificar, estatisticamente, a eliminação de indivíduos claramente *outlier*.

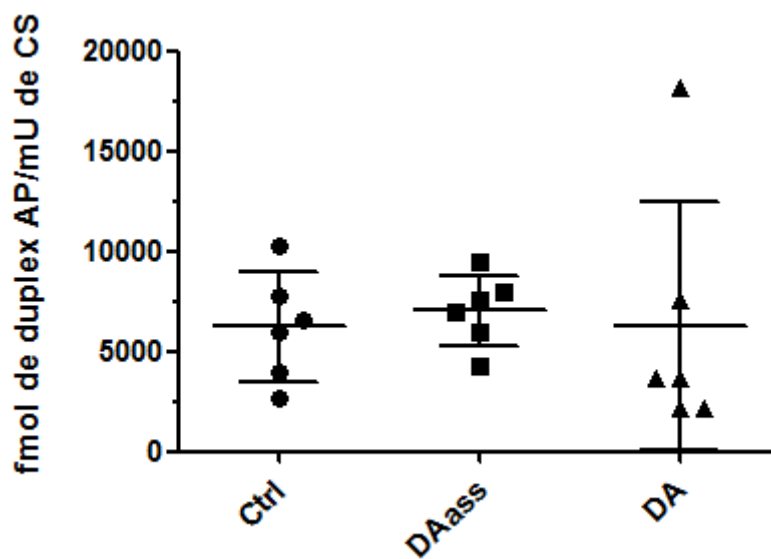
A.



B.



C.



D.

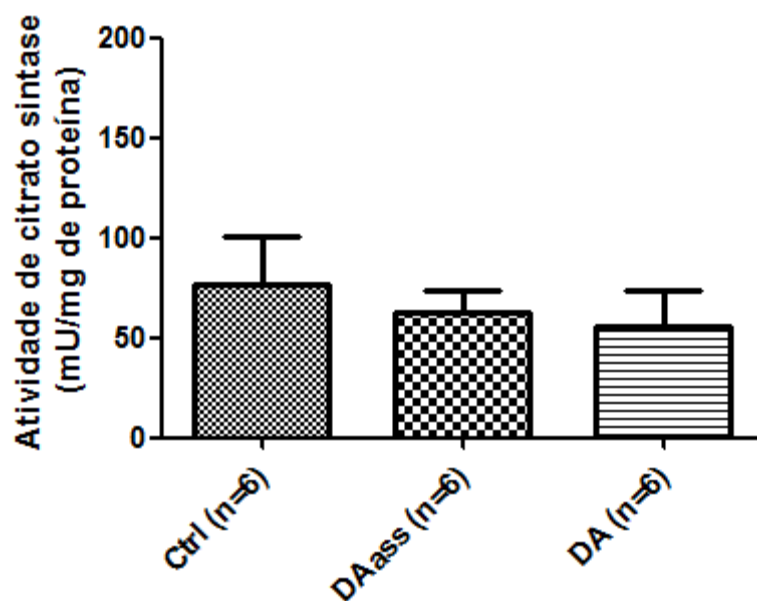


Figura 13. Medida da atividade de AP endonuclease em extratos mitocondriais de córtex temporal humano dos grupos experimentais. Para cada reação, foram utilizados 50 fmoles do duplex AP. A - Verificação da ocorrência de incisão do duplex AP, em gel desnaturante, por meio da incubação com os extratos mitocondriais dos indivíduos pertencentes aos grupos experimentais. Os substratos foram incubados por 15 minutos a 37°C com 25 ng

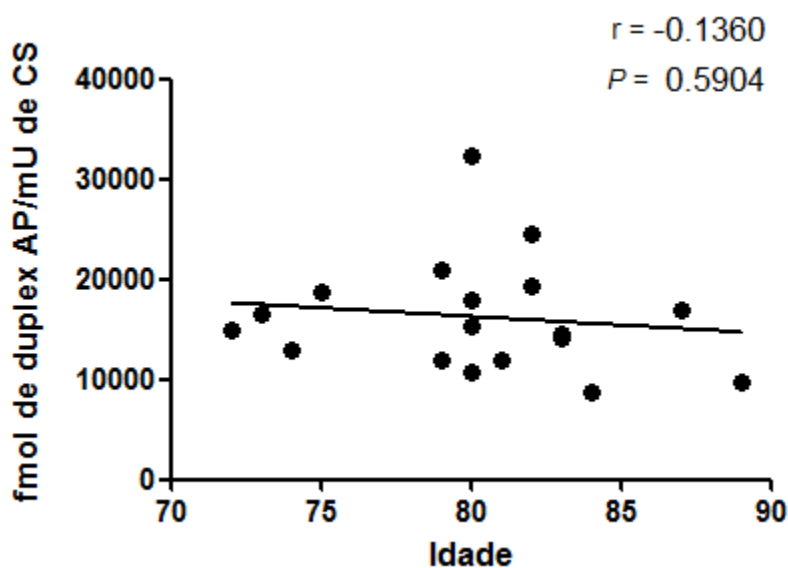
de proteína. **APE1⁻** – duplex AP sem extrato e na ausência da enzima comercial; **APE1⁺** – duplex AP na presença da enzima comercial; **Ctrl** – grupo controle; **DA** – grupo dos indivíduos com a doença de Alzheimer; **DAass** – grupo dos indivíduos com DA assintomático. Os números representam os indivíduos classificados segundo a tabela 3. **B** - Gráfico da atividade de incisão da enzima APE1 em córtex temporal humano dos três grupos sem a normalização com a atividade de citrato sintase. Este gráfico apresenta a média \pm desvio padrão de dois ensaios realizados em duplicata. **C** – Gráfico da atividade de incisão de APE1 em córtex temporal humano normalizado com a atividade de citrato sintase. Este gráfico apresenta a média \pm desvio padrão de dois ensaios realizados em duplicata. **D** – Gráfico da média da atividade de citrato sintase por mg de proteína dos indivíduos dos grupos experimentais.

4.5. Correlação entre a atividade de APE1 e critérios sócio-demográficos

4.5.1. Correlação entre a atividade de APE1 e a idade

Com a finalidade de verificar se a idade dos indivíduos exerce influência sobre a atividade de incisão de APE1, foram calculadas as correlações entre a atividade enzimática de cada indivíduo e sua respectiva idade. Os resultados obtidos estão apresentados na figura 14, onde se pode observar que existe uma correlação negativa fraca ($r = -0,136$) entre a atividade encontrada no cerebelo e a idade. No córtex temporal, a correlação é positiva ($r = 0,2727$), porém também fraca e não significativa estatisticamente ($p = 0,2735$). Isso sugere que não há correlação entre essas duas variáveis, não havendo influência da idade na atividade enzimática.

A. Cerebelo



B. Córtex temporal

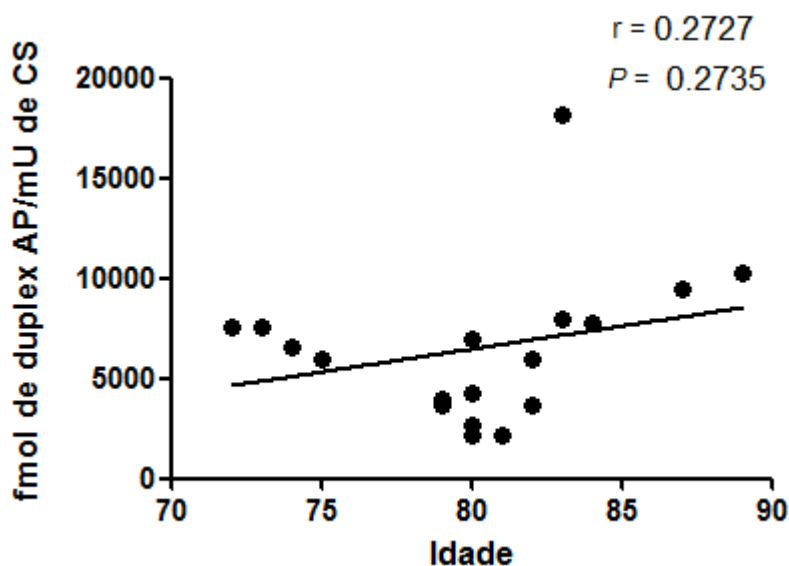
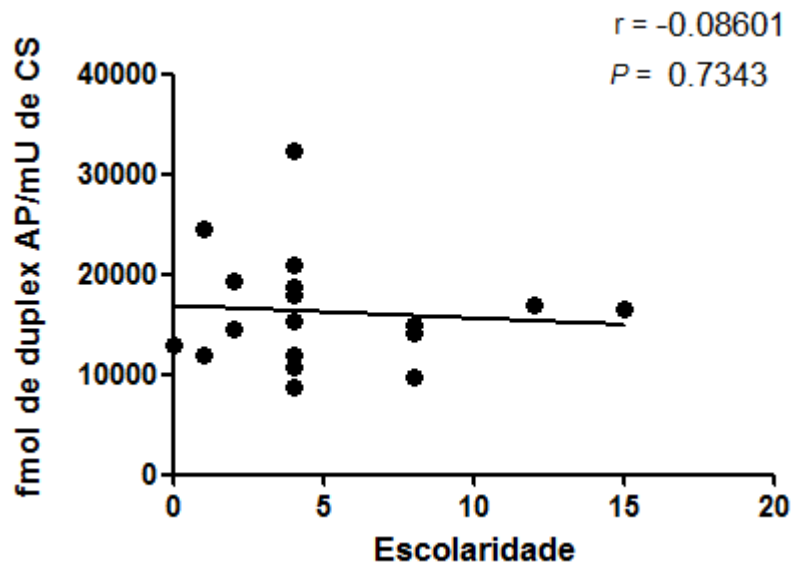


Figura 14. Correlação entre a atividade de AP endonuclease dos extratos mitocondriais de cerebelo e córtex temporal e a idade respectiva dos indivíduos. **A** – Correlação negativa fraca entre a atividade de APE1 do cerebelo e a idade dos indivíduos. **B** - Correlação positiva fraca entre a atividade de APE1 do córtex temporal e a idade dos indivíduos. As duas correlações não são estatisticamente significativas ($p > 0,05$). r – Coeficiente de Pearson.

4.5.2. Correlação entre a atividade de APE1 e a escolaridade

Também foi analisada a correlação entre a atividade de APE1 nas duas regiões cerebrais e o nível educacional de cada indivíduo, uma vez que a escolaridade foi sugerida como um fator protetor no desenvolvimento de DA. Como pode ser visualizada na figura 15, a atividade de APE1 em cerebelo não apresentou nenhuma correlação com a escolaridade ($r = -0,08601$), enquanto que, no córtex temporal observa-se uma correlação positiva fraca ($r=0,2259$) que, no entanto, não foi significativa estatisticamente. Com isso, pode-se concluir que esse critério também não correlaciona linearmente com a atividade enzimática.

A. Cerebelo



B. Córtex temporal

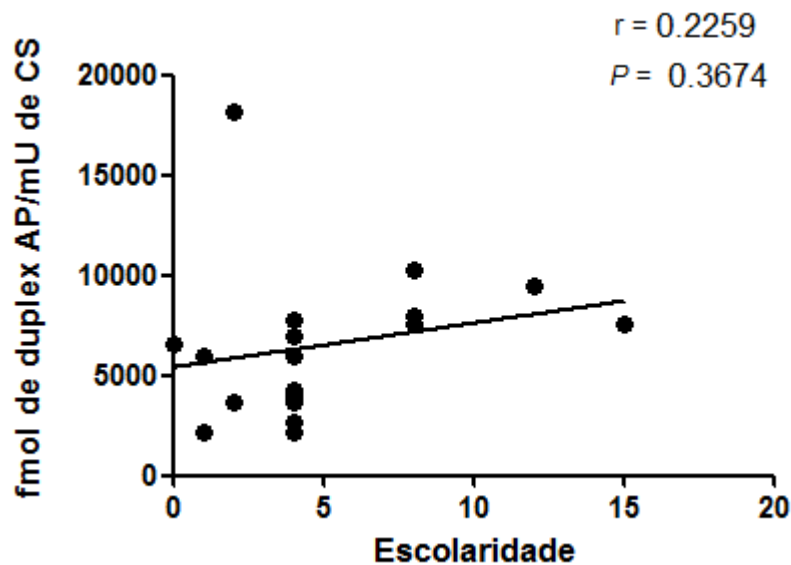


Figura 15. Correlação entre a atividade de AP endonuclease dos extratos mitocondriais de cerebelo e córtex temporal e a escolaridade respectiva dos indivíduos. A – Nenhuma correlação entre a atividade de APE1 do cerebelo e a escolaridade dos indivíduos. B – Correlação positiva fraca entre a atividade de APE1 do córtex

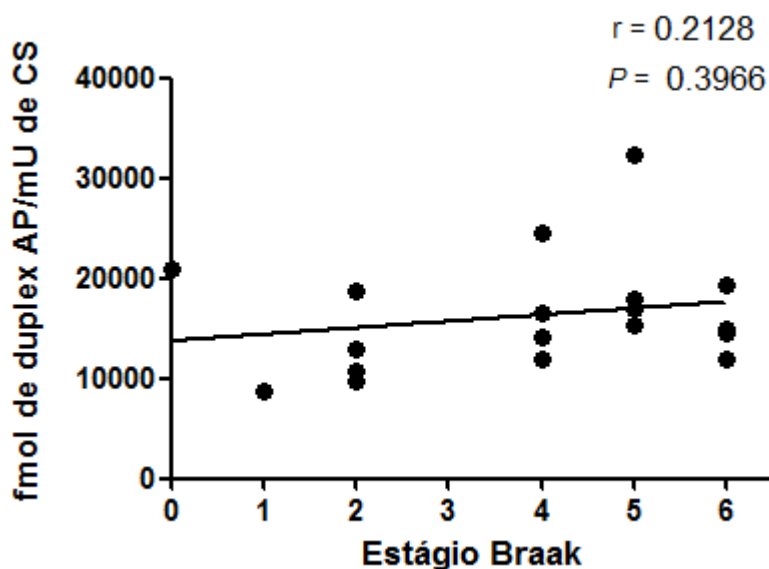
temporal e a escolaridade dos indivíduos. As duas correlações não são estatisticamente significativas ($p > 0,05$). r - Coeficiente de Pearson.

4.6. Correlação entre a atividade de APE1 e critérios neuropatológicos

4.6.1. Correlação entre a atividade de APE1 e o estágio de Braak

O estágio de Braak (Braak e Braak, 1991) avalia a quantidade de emaranhados neurofibrilares no córtex cerebral. É classificado em seis estágios relacionando a concentração dos emaranhados com a progressão da doença, sendo, portanto, o número I equivalente à menor concentração de emaranhados em regiões cerebrais associadas ao início da doença, e o número VI equivalente à maior concentração de emaranhados em regiões cerebrais associadas à fase tardia. Com a finalidade de verificar se a atividade de APE1 está diretamente associada ao acúmulo de emaranhados no cérebro foram realizadas análises de correlações tanto no cerebelo quanto no córtex temporal. Nessas duas regiões, observa-se que a correlação é fraca, não existindo, portanto, nenhuma associação entre a atividade enzimática e a severidade do quadro neuropatológico dos indivíduos (figura 16).

A. Cerebelo



B. Córtex temporal

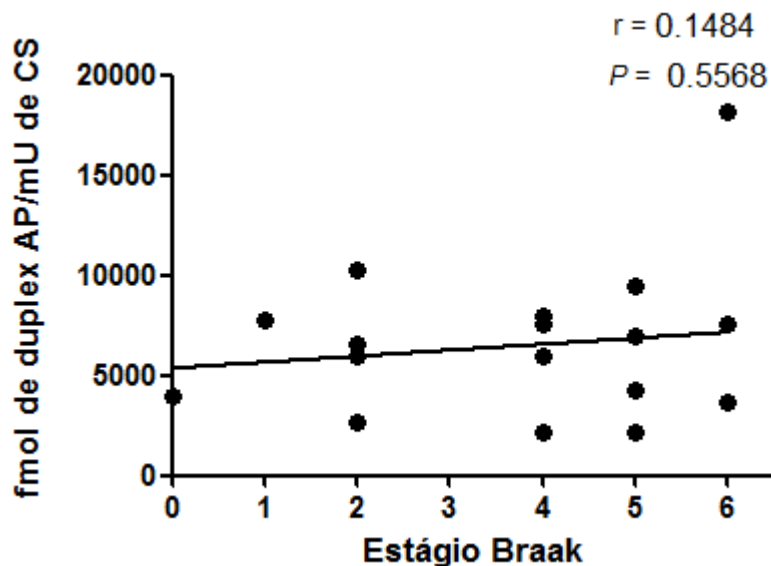


Figura 16. Correlação entre a atividade de AP endonuclease dos extratos mitocondriais de cerebelo e córtex temporal e o estágio de Braak respectivo de cada indivíduo. **A** – Correlação positiva fraca entre a atividade de APE1 do cerebelo e o estágio de Braak dos indivíduos. **B** - Correlação positiva fraca entre a atividade de APE1 do córtex temporal e o estágio de Braak dos indivíduos. As duas correlações não são estatisticamente significativas ($p > 0,05$). r – Coeficiente de Pearson.

4.6.2. Correlação entre a atividade de APE1 e CERAD

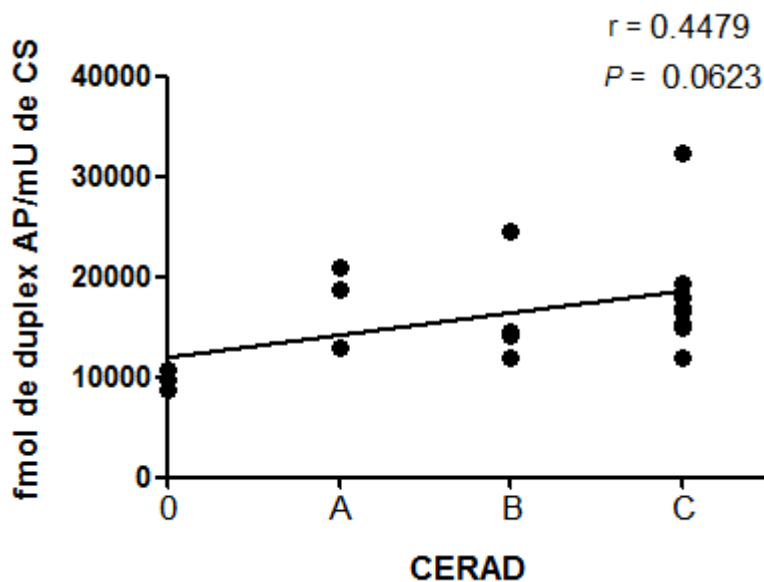
O CERAD é um critério neuropatológico utilizado para avaliar a distribuição de placas neuríticas no córtex cerebral e é classificado em quatro estágios 0, A, B e C, sendo que 0 corresponde a ausência de placas; A corresponde ao estágio leve; B indica fase moderada e C indica uma alta frequência de placas.

Como o CERAD avalia um dos achados neuropatológicos da DA, a correlação entre a atividade de APE1 e o CERAD é importante para verificar uma possível influência da atividade enzimática no desenvolvimento e severidade do acúmulo de placas. Como pode ser observado na figura 17, o cerebelo apresenta uma correlação positiva ($r = 0,4479$) entre atividade de APE1 e índice CERAD. Essa correlação, entretanto, não atingiu significância estatística ($p = 0,06$). No entanto, como o

número de indivíduos analisados ainda é pequeno (18), é possível que uma análise de um número maior de indivíduos atingisse significância estatística.

Por outro lado, a análise dos dados obtidos para as amostras de córtex temporal não indicou nenhuma correlação ($r = -0,084$ e $p = 0,74$) entre atividade de APE1 e frequência de placas. A diferença observada na correlação entre índice CERAD e atividade de APE1 entre as duas regiões suporta a proposição, obtida usando outros critérios patológicos e moleculares, de que diferentes regiões cerebrais apresentam suscetibilidade distinta aos eventos moleculares desencadeados durante o desenvolvimento da doença.

A. Cerebelo



B. Córtex temporal

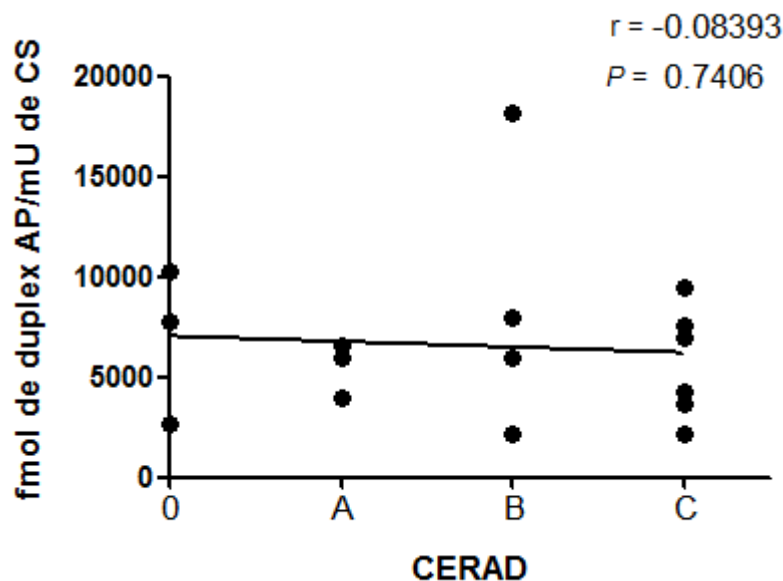


Figura 17. Correlação entre a atividade de AP endonuclease dos extratos mitocondriais de cerebelo e córtex temporal e o CERAD respectivo de cada indivíduo. **A** – Correlação positiva fraca entre a atividade de APE1 do cerebelo e o CERAD dos indivíduos. **B** - Nenhuma correlação entre a atividade de APE1 do córtex temporal e o CERAD dos indivíduos. As duas correlações não são estatisticamente significativas. r – Coeficiente de Pearson.

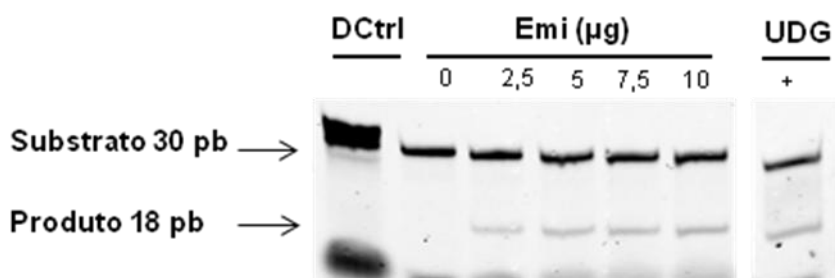
4.7. Ensaio da atividade de Uracil DNA glicosilase (UDG)

4.7.1. Medida da atividade de UDG em cerebelo de indivíduos com critérios de exclusão

Uma vez que, em mitocôndrias de células de mamíferos, a remoção de desoxi-uracilas de DNA dupla fita é atribuída, principalmente, à enzima uracil DNA glicosilase (UDG) (Kavli et al., 2002), considerou-se, neste estudo, a atividade de incisão de um substrato contendo uracila presente nos extratos mitocondriais brutos como a atividade desta enzima. A medida da atividade de UDG *in vitro* em função de diferentes concentrações de proteína cerebelar pode ser visualizada na figura 18. Os resultados obtidos neste ensaio indicam que a utilização de 5 μ g de extrato mitocondrial, que corresponde a uma taxa de incisão de aproximadamente 16%, resulta em uma atividade de incisão que se localiza na faixa linear da curva de atividade (painel

B), e portanto, adequada para a realização dos ensaios comparativos entre os diferentes indivíduos dos grupos experimentais. Não foram realizados testes com diferentes tempos de incubação para o ensaio da atividade de UDG, uma vez que esse parâmetro é bem estabelecido na literatura e corresponde a 1 hora de incubação a 37°C.

A.



B.

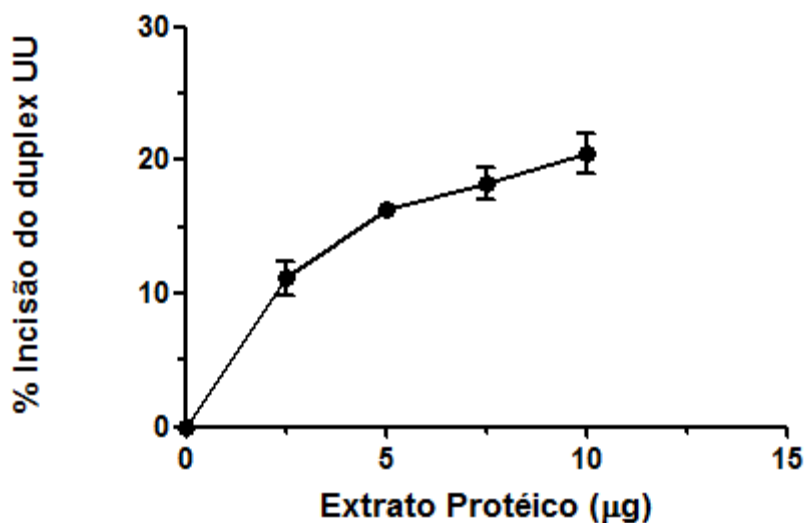


Figura 18. Determinação da atividade de UDG *in vitro* em função da concentração de extrato mitocondrial em amostras de cerebelo humano. Para cada reação, foram utilizados 50 fmoles do duplex UU (oligonucleotídeo com uracila na posição 12) que foram incubados por 1 hora a 37°C com as seguintes concentrações de proteína: 0 µg; 2,5 µg; 5 µg; 7,5 µg e 10 µg. **A** – Verificação da ocorrência de incisão, em gel desnaturante, com concentrações de

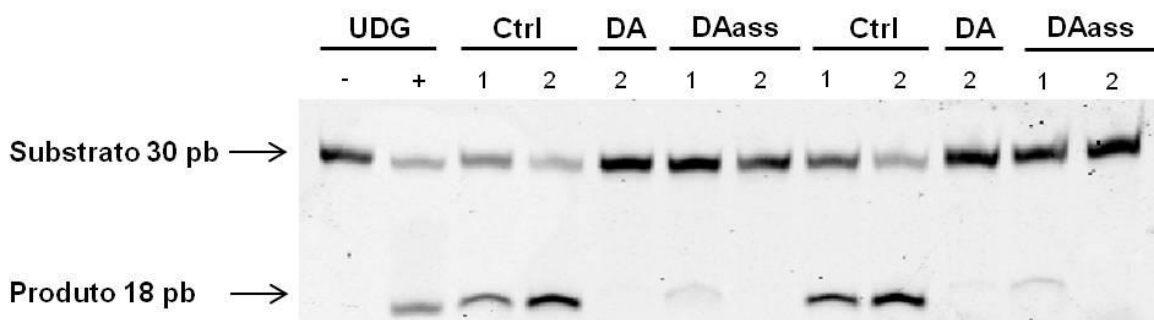
extrato de cerebelo humano de exclusão. **DCtrl** – 50 fmoles do duplex controle incubados com 10 µg de extrato; **UDG⁺** - Duplex UU incubado com a enzima comercial UDG; **Emi** – Extrato mitocondrial. **B** – Gráfico da atividade de incisão da enzima UDG em diferentes concentrações de extrato mitocondrial de cerebelo humano de exclusão. Este gráfico apresenta a média ± desvio padrão de dois ensaios independentes.

4.7.2. Análise da atividade de UDG em cerebelo dos grupos experimentais

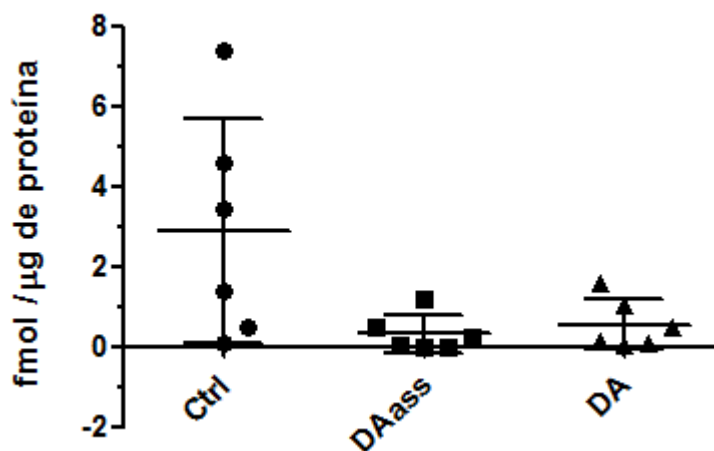
As condições estabelecidas no ensaio de UDG utilizando cerebelo humano de exclusão foram utilizadas para comparar os indivíduos dos grupos experimentais. O painel A da figura 19 apresenta um gel desnaturante típico desse ensaio, em que se pode notar a formação do produto decorrente da incisão do duplex (flecha).

O painel B apresenta a média de incisão do duplex UU por µg de proteína de cada grupo, bem como a média de cada indivíduo. Nesse painel, a porcentagem de incisão não está normalizada com a atividade de CS e observa-se que a atividade de incisão do duplex foi bastante inferior nos grupos DA e DA assintomático quando comparados com o grupo controle. Os dados normalizados pela atividade de citrato sintase estão apresentados no painel C, no qual a média da atividade de incisão ainda aparece significativamente reduzida nos grupos de DA e DA assintomático quando comparado ao grupo controle. É importante ressaltar que o grupo controle apresentou uma grande variação entre os indivíduos, o que dificulta a análise comparativa. Entretanto, houve diferença significativa entre o grupo DA assintomático e o grupo DA quando comparados ao controle.

A.



B.



C.

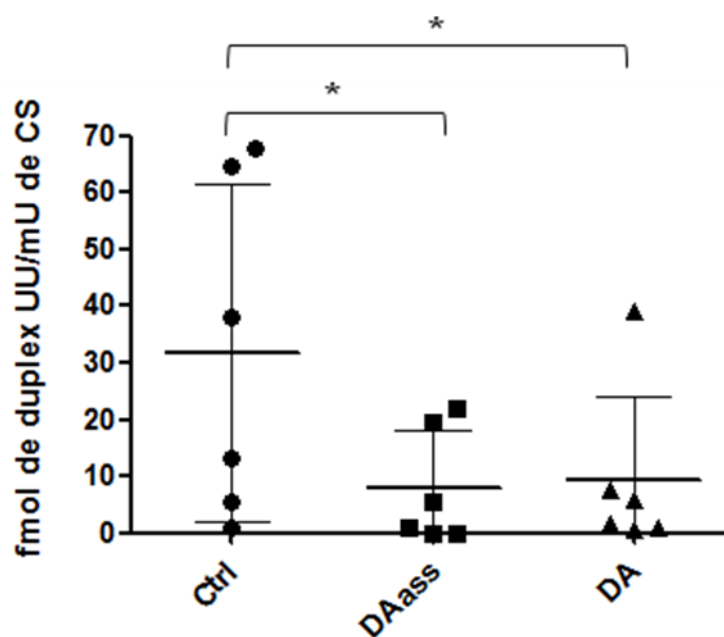


Figura 19. Atividade de UDG em extratos mitocondriais de cerebelo humano dos grupos experimentais. Para cada reação, foram utilizados 50 fmoles do duplex UU. **A** - Verificação da ocorrência de incisão do duplex UU, em gel desnaturante, por meio da incubação com os extratos mitocondriais dos indivíduos pertencentes aos grupos experimentais. Os substratos foram incubados por 1 hora a 37°C com 5 μg de proteína do grupo controle e 10 μg de proteína dos grupos DA e DA assintomático. **UDG⁻** – duplex UU sem extrato e na ausência da enzima comercial; **UDG⁺** – duplex UU na presença da enzima comercial; **Ctrl** – grupo controle; **DA** – grupo dos indivíduos com a

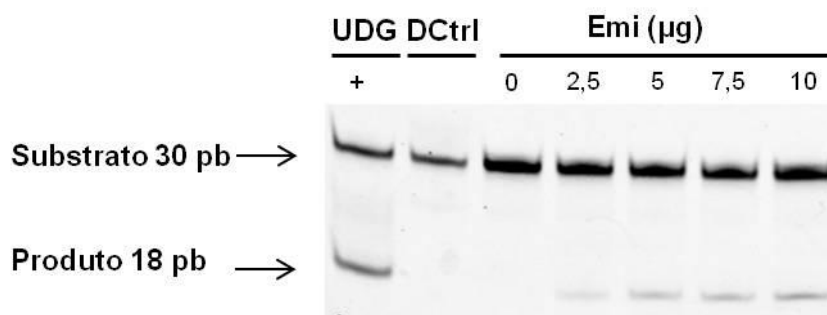
doença de Alzheimer; **DAass** – grupo dos indivíduos com DA assintomático. **B** - Gráfico da atividade de incisão da enzima UDG em cerebelo humano dos três grupos do estudo sem a normalização com a atividade de citrato sintase. Este gráfico apresenta a média \pm desvio padrão de dois ensaios realizados em duplicata. **C** – Gráfico da atividade de incisão da enzima UDG em cerebelo humano normalizado com a atividade de citrato sintase. Este gráfico apresenta a média \pm desvio padrão de dois ensaios realizados em duplicata. * (asterisco) – $p < 0.05$. As atividades de CS correspondem às mesmas apresentadas na figura 9.

4.7.3. Medida da atividade de UDG em córtex temporal de indivíduos com critérios de exclusão

As condições do ensaio de UDG em extratos mitocondriais de córtex temporal foram estabelecidas usando amostras de indivíduos do grupo de exclusão conforme descrito para a região do cerebelo, e estão apresentadas na figura 20.

O painel A apresenta um gel típico que mostra a formação do produto de incisão do duplex UU (indicado pela flecha) quando incubado com diferentes concentrações de proteína do córtex temporal por 1 hora a temperatura de 37°C. O painel B da figura apresenta a porcentagem de incisão do duplex UU em função de diferentes concentrações de proteína dos extratos mitocondriais. A concentração de 5 μg de extrato resultou em uma atividade de incisão de aproximadamente 10%, dentro da faixa linear da curva de atividade, e foi, portanto, escolhida como a concentração para ser utilizada nos ensaios com as amostras experimentais. Assim como descrito anteriormente, não foram realizadas medidas da atividade enzimática em função do tempo.

A.



B.

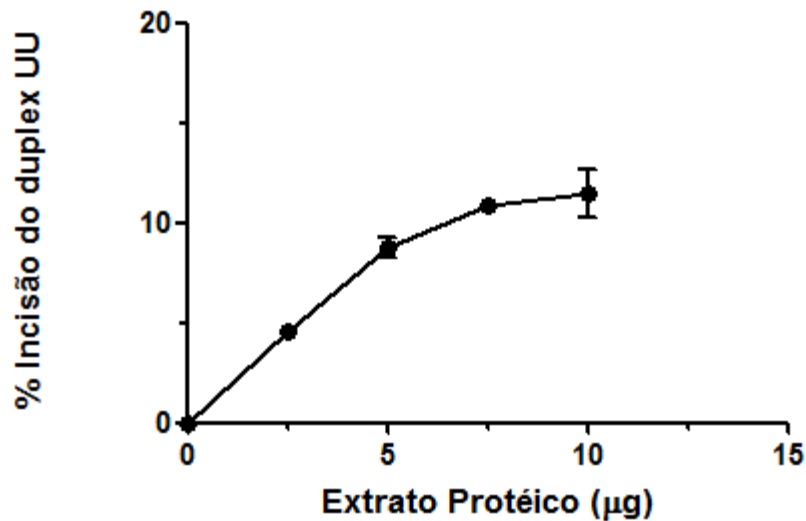


Figura 20. Determinação da atividade de UDG *in vitro* em função da concentração de extrato mitocondrial em amostras de córtex temporal humano. Para cada reação, foram utilizados 50 fmoles do duplex UU que foram incubados por 1 hora a 37°C com as seguintes concentrações de proteína: 0 µg; 2,5 µg; 5 µg; 7,5 µg e 10 µg. **A** – Verificação da ocorrência de incisão, em gel desnaturante, com concentrações de extrato de córtex temporal humano de exclusão. **DCtrl** – 50 fmoles do duplex controle incubados com 10 µg de extrato; **UDG⁺** - Duplex UU incubado com a enzima comercial UDG; **Emi** – Extrato mitocondrial. **B** – Gráfico da atividade de incisão da enzima UDG em diferentes concentrações de extrato mitocondrial de córtex temporal humano de exclusão. Este gráfico apresenta a média ± desvio padrão de dois ensaios independentes.

4.7.4. Análise da atividade de UDG em córtex temporal dos grupos experimentais

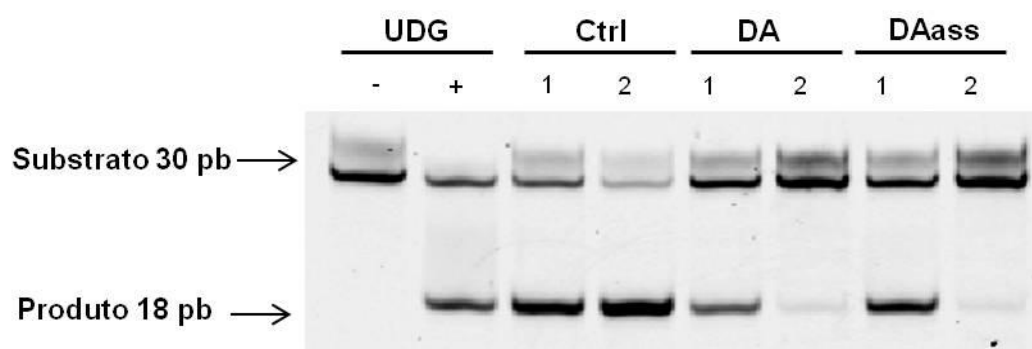
As condições estabelecidas no ensaio de UDG com as amostras de exclusão foram utilizadas para medir a atividade dessa enzima nos indivíduos de cada grupo experimental, e os resultados estão apresentados na figura 21.

O painel A apresenta um gel típico desse ensaio com dois indivíduos de cada grupo experimental, em que se pode notar a formação do produto de incisão com intensidades diferentes para cada amostra.

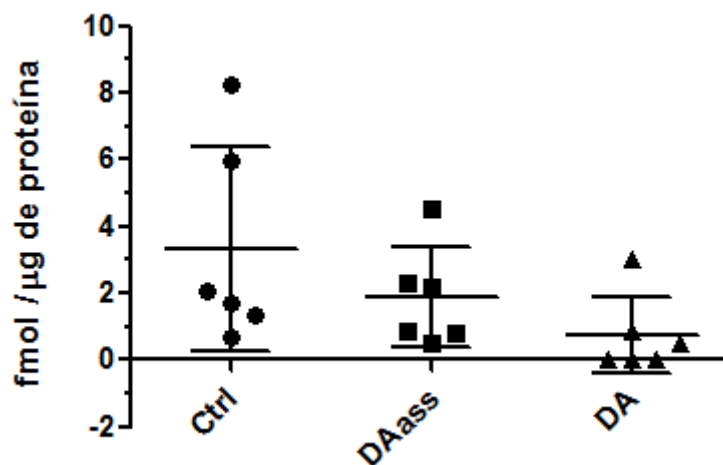
O painel B mostra a média da taxa de incisão do duplex UU por µg de proteína em cada grupo experimental, bem como a distribuição de cada indivíduo

analisado. Observa-se que os grupos DA assintomático e DA apresentam menor atividade de incisão em relação ao grupo controle. Quando os valores da atividade de incisão são normalizados pelo conteúdo mitocondrial, através da atividade de CS, a atividade enzimática obtida para os grupos DA e DA assintomático continua significativamente inferior ao controle (painel C). Além disso, a atividade média obtida para o grupo DA também foi significativamente menor do que a obtida para o grupo DA assintomático.

A.



B.



C.

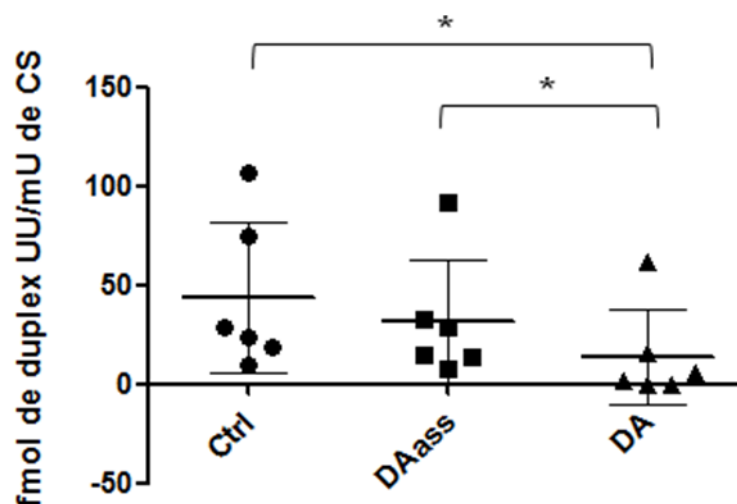


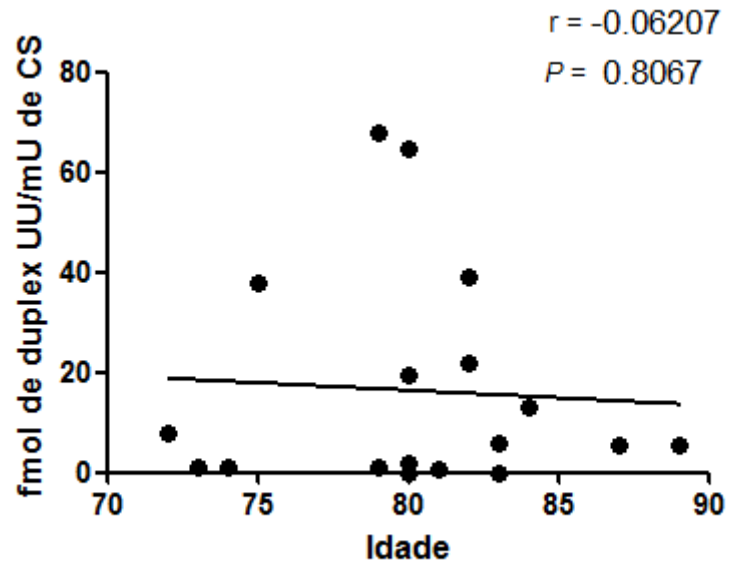
Figura 21. Atividade de UDG em extratos mitocondriais de córtex temporal humano dos grupos experimentais. Para cada reação, foram utilizados 50 fmoles do duplex UU. **A** - Verificação da ocorrência de incisão do duplex UU, em gel desnaturante, por meio da incubação com os extratos mitocondriais dos indivíduos pertencentes aos grupos experimentais. Os substratos foram incubados por 1 hora a 37°C com 5 µg de proteína do grupo controle. **UDG⁻** – duplex UU sem extrato e na ausência da enzima comercial; **UDG⁺** – duplex UU na presença da enzima comercial; **Ctrl** – grupo controle; **DA** – grupo dos indivíduos com a doença de Alzheimer; **DAass** – grupo dos indivíduos com DA assintomático. **B** - Gráfico da atividade de incisão da enzima UDG em córtex temporal humano dos três grupos do estudo sem a normalização com a atividade de citrato sintase. Este gráfico apresenta a média ± desvio padrão de dois ensaios realizados em duplicata. **C** – Gráfico da atividade de incisão dos grupos experimentais normalizada com a atividade de citrato sintase. * (asterisco) – $p < 0,05$. As atividades de CS correspondem às mesmas apresentadas na figura 11.

4.8. Correlação entre a atividade de UDG e critérios sócio-demográficos

4.8.1. Correlação entre a atividade de UDG e a idade

Tanto no cerebelo quanto no córtex temporal, não houve correlação significativa entre a atividade de UDG e a idade ($r = -0,06$ e $0,03$, respectivamente), indicando que a atividade de UDG nessas regiões cerebrais não é modulada pela idade, como pode ser observada na figura 22.

A. Cerebelo



B. Córtex temporal

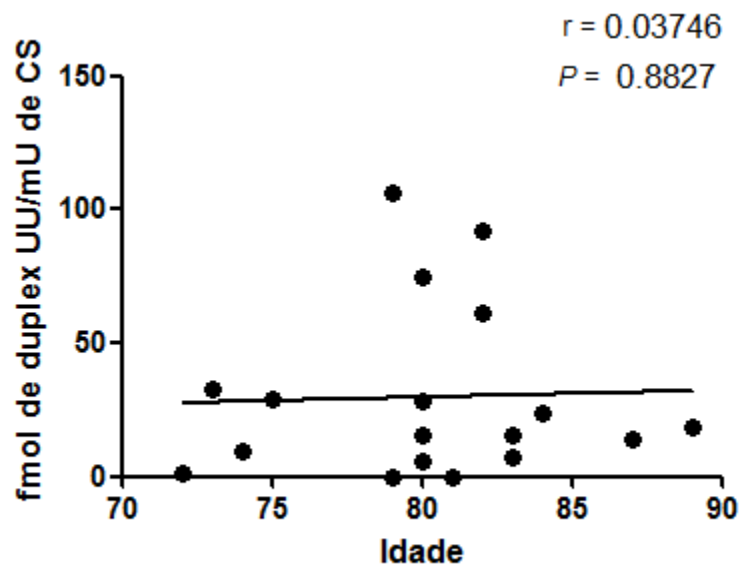


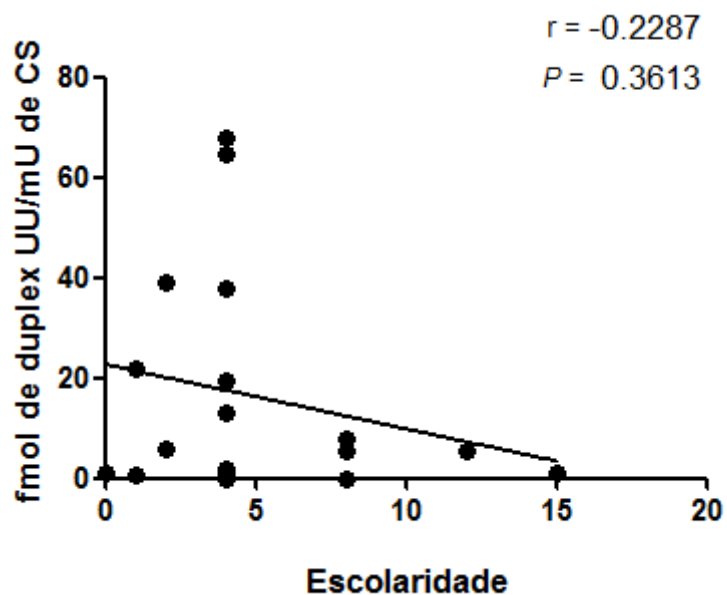
Figura 22. Correlação entre a atividade de UDG dos extratos mitocondriais de cerebelo e córtex temporal e a idade respectiva dos indivíduos. A – Nenhuma correlação entre a atividade de UDG do cerebelo e a idade dos

indivíduos. **B** – Nenhuma correlação entre a atividade de UDG do córtex temporal e a idade dos indivíduos. **r** – Coeficiente de Pearson.

4.8.2. Correlação entre a atividade de UDG e a escolaridade

Tanto no cerebelo quanto no córtex temporal observou-se uma fraca correlação negativa entre a atividade de UDG e a escolaridade ($r = -0,22$ e $-0,18$, respectivamente). Entretanto, em ambos os tecidos, a correlação não foi estatisticamente significativa ($p = 0,36$ e $0,46$, respectivamente) (figura 23), indicando que a atividade dessa enzima não é modulada em resposta a fatores associados com escolaridade.

A. Cerebelo



B. Córtex temporal

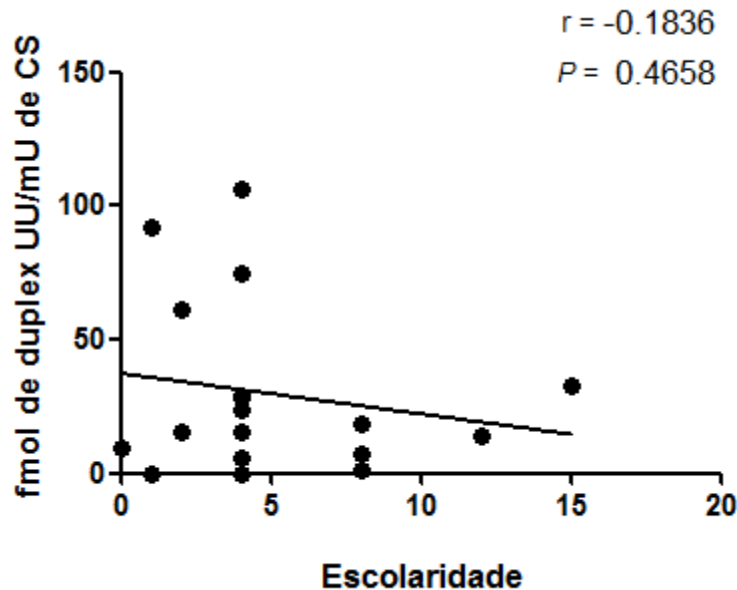


Figura 23. Correlação entre a atividade de UDG dos extratos mitocondriais de cerebelo e córtex temporal e a escolaridade respectiva dos indivíduos. **A** – Correlação negativa fraca entre a atividade de UDG do cerebelo e a escolaridade dos indivíduos. **B** – Correlação negativa fraca entre a atividade de UDG do córtex temporal e a escolaridade dos indivíduos. As duas correlações não apresentaram significância estatística ($p > 0,05$). r – Coeficiente de Pearson.

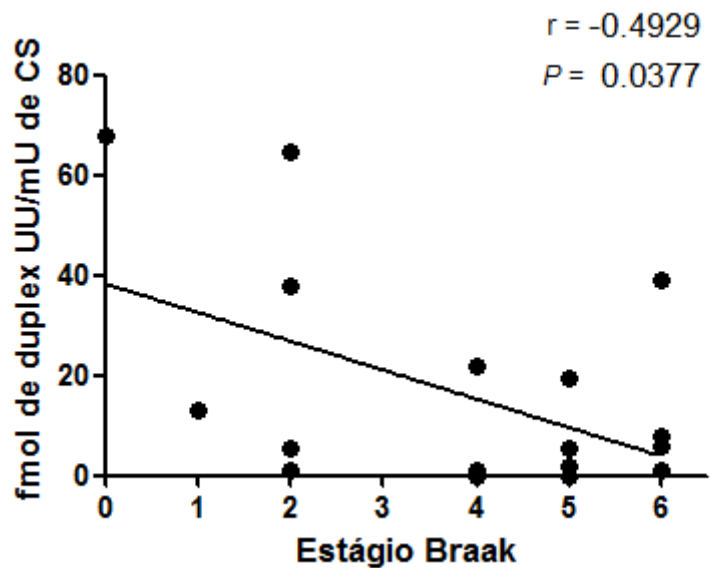
4.9. Correlação entre a atividade de UDG e critérios neuropatológicos

4.9.1. Correlação entre a atividade de UDG e o estágio de Braak

Na figura 24, pode-se observar que existe uma correlação inversa entre a atividade de incisão de UDG e o estágio de Braak nas duas regiões cerebrais ($r = -0,49$ e $-0,43$, para cerebelo e córtex, respectivamente). Essa correlação negativa foi estatisticamente significativa ($p = 0,03$) no cerebelo, mas não atingiu significância estatística no córtex temporal ($p = 0,07$). Esses resultados paralelam os resultados obtidos em outro estudo (Weismann et al., 2007) usando extrato celular total, no qual os autores encontraram uma correlação inversa entre atividade de UDG e o estágio de Braak dos pacientes. Essa observação sugere que a atividade de UDG mitocondrial pode ser modulada pelo acúmulo de emaranhados neurofibrilares, ou, inversamente,

ser um fator de risco que favorece o acúmulo dessas alterações neuropatológicas quando a atividade da enzima está baixa.

A. Cerebelo



B. Córtex temporal

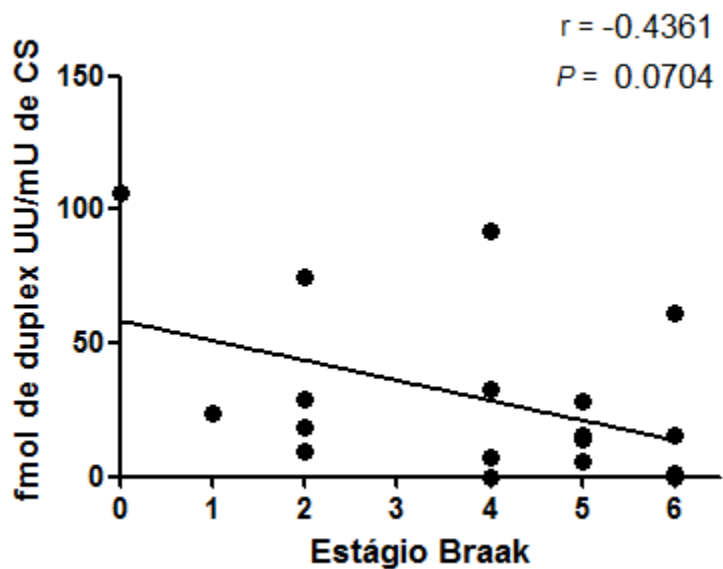
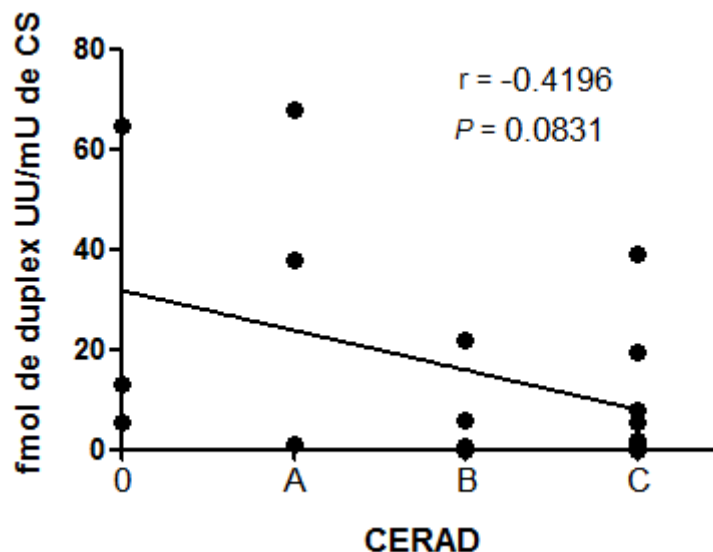


Figura 24. Correlação entre a atividade de UDG dos extratos mitocondriais de cerebello e córtex temporal e o estágio Braak dos indivíduos. A – Correlação negativa estatisticamente significativa entre a atividade de UDG do cerebello e o estágio Braak dos indivíduos ($p < 0,05$). B - Correlação negativa moderada entre a atividade de UDG do córtex temporal e estágio Braak dos indivíduos. r – Coeficiente de Pearson.

4.9.2. Correlação entre a atividade de UDG e CERAD

Assim como observado para o critério de Braak, a atividade de incisão de UDG apresentou uma correlação inversa com o índice CERAD ($r = -0,41$ e $-0,29$ para cerebello e córtex temporal, respectivamente). Entretanto, em ambos os tecidos, a correlação não apresentou significância estatística (figura 25), indicando que a concentração de placas neuríticas não interfere, ou é modulada, pela atividade dessa enzima, pelo menos nesse pequeno grupo de indivíduos analisados.

A. Cerebello



B. Córtex temporal

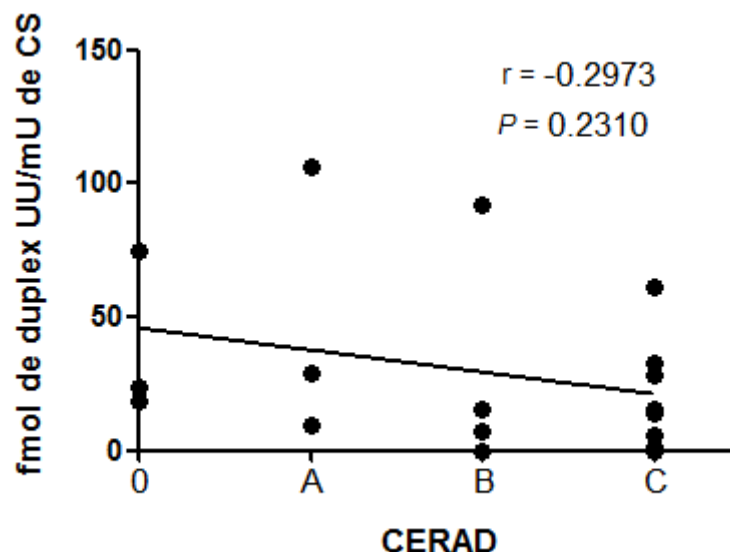


Figura 25. Correlação entre a atividade de UDG dos extratos mitocondriais de cerebelo e córtex temporal e o CERAD respectivo de cada indivíduo. **A** – Correlação negativa moderada entre a atividade de UDG do cerebelo e os valores de CERAD dos indivíduos. **B** – Correlação negativa moderada entre a atividade de UDG do córtex temporal e valores de CERAD dos indivíduos. As correlações não são estatisticamente significativas ($p > 0,05$). r – Coeficiente de Pearson.

4.10. Ensaio da atividade de oxoguanina DNA glicosilase (OGG1)

4.10.1. Medida da atividade de OGG1 no cerebelo de indivíduos com critérios de exclusão

Nosso objetivo inicial incluía medir também a atividade da DNA glicosilase OGG1, que catalisa a remoção de purinas oxidadas, como 8-oxoGua, nos grupos experimentais utilizados aqui. No trabalho de Weissman et al. (2007), utilizando extrato total de córtex, as reações enzimáticas com o oligonucleotídeo OG foram incubadas por 17 horas a 32°C, utilizando 16 µg de proteína encefálica humana. As condições experimentais descritas nesse trabalho foram reproduzidas com diferentes concentrações de extrato mitocondrial cerebelar humano de exclusão e o gel obtido após a separação eletroforética das amostras pode ser visualizado na figura 26. Nessas

condições, não foi observada nenhuma incisão detectável do substrato. Por isso, foram realizadas algumas alterações no protocolo para aumentar a eficiência do processo enzimático.

Primeiramente, modificou-se a temperatura de incubação para 37°C, que corresponde à temperatura ótima da reação de incisão por essa glicosilase. Com isso, é necessário reduzir o tempo de reação, para minimizar a degradação da enzima por proteases, e dos substratos por endonucleases presentes no extrato durante a incubação. Além disso, utilizou-se um banho seco com agitação para aumentar o contato entre as moléculas, facilitando assim, a ocorrência da incisão. Como podem ser visualizadas na figura 27, essas alterações resultaram na formação de produtos de incisão detectáveis nessas condições experimentais, uma vez que se obteve 30% de produto nas reações utilizando 50 µg de proteína com um tempo de incubação de 4 horas e 30 minutos (figura 27, painel B).

Outra modificação introduzida foi a utilização de frações mitocondriais, ao invés dos extratos, que está representado na figura 28. Nessa padronização, alteraram-se as concentrações dos reagentes, visando o aumento da formação de produto. Logo, a concentração final de cada reagente consistiu em: 1 mM EDTA, 20 mM Hepes-KOH pH 7.4, 2 mM DTT, 5% glicerol, 300 mM KCl. Além disso, utilizou-se um banho com circulação de água para promover o mesmo efeito do banho com agitação, e as amostras não foram precipitadas com a finalidade de evitar a perda de material nesse processo. Também aumentou o tempo de incubação com Proteinase K e SDS 0,5% para 30 minutos. A duração da reação foi de 5 horas. O gel da figura 28 mostra que está ocorrendo incisão do substrato pela enzima OGG1, porém o aparecimento de bandas inespecíficas com peso molecular próximo ao do produto formado inviabiliza a quantificação correta. Essas bandas inespecíficas não aparecem no gel logo após o processo de marcação e purificação do substrato, bem como não apresentam o mesmo peso molecular de nucleotídeos livres, o que indica que podem ser produto de degradação inespecífica do oligonucleotídeo marcado.

Desta forma, as condições desse ensaio ainda estão sendo estabelecidas para medir a atividade de OGG1 nas amostras dos indivíduos dos grupos experimentais.

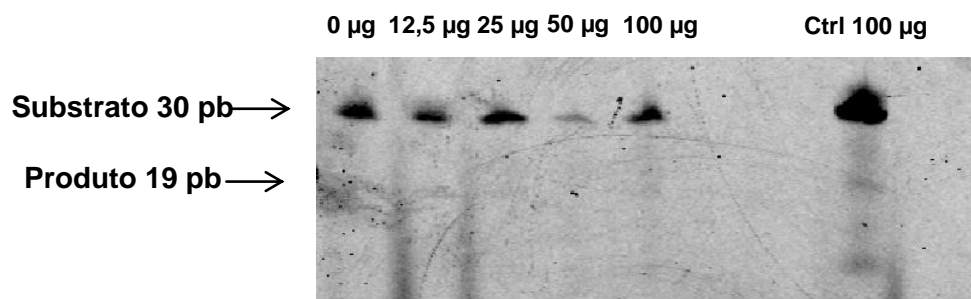
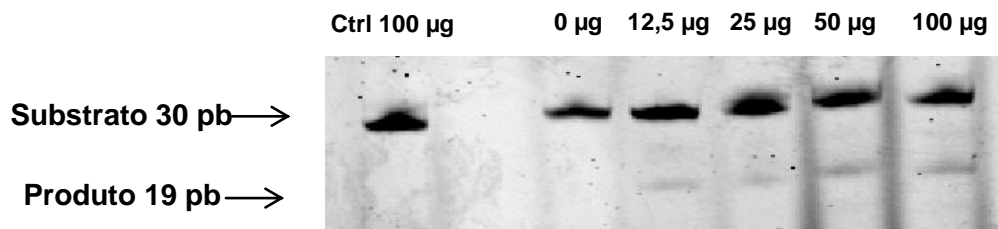


Figura 26. Medida da atividade de OGG1 em extratos mitocondrial de cerebello humano em função da concentração de proteína, segundo a metodologia de Weissman et al. (2007). Para cada reação, foram utilizados 20 fmoles do duplex OG (oligonucleotídeo com a base oxidada 8-oxoGua) que foram incubados a 32°C por 17 horas em banho seco sem agitação. Foram utilizadas as seguintes concentrações de extrato mitocondrial de cerebello humano de exclusão: 0 µg; 12,5 µg; 25 µg; 50 µg e 100 µg. A incubação com Proteinase K (0,25mg/mL) e SDS 0,5% foi de 15 minutos a 55°C, e posteriormente, as amostras foram precipitadas com etanol gelado. **Ctrl 100 µg** – 20 fmoles do duplex controle incubados com 100 µg de extrato.

A.



B.

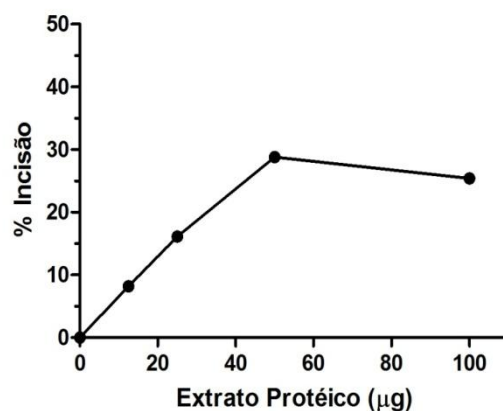


Figura 27. Medida da atividade de OGG1 em extratos mitocondrial de cerebello humano em função da concentração de proteína, com modificações nas condições experimentais (descrita no texto). Para cada reação, foram utilizados 20 fmoles do duplex OG que foram incubados por 4 horas e 30 minutos a 37°C em um banho com agitação. Foram utilizadas as seguintes concentrações de proteínas: 0 µg; 12,5 µg; 25 µg; 50 µg e 100 µg. A incubação com Proteinase K (0,25 mg/mL) e SDS 0,5% foi de 15 minutos a 55°C, e posteriormente, as amostras foram precipitadas. **A** – Verificação da ocorrência de incisão pela enzima OGG1 nas diferentes concentrações de extrato. **Ctrl 100 µg** – 20 fmoles do duplex controle incubado com 100 µg de extrato. **B** – Gráfico da atividade de incisão da enzima OGG1 em diferentes concentrações de extrato mitocondrial de cerebello humano de exclusão. Este gráfico representa apenas um ensaio enzimático.

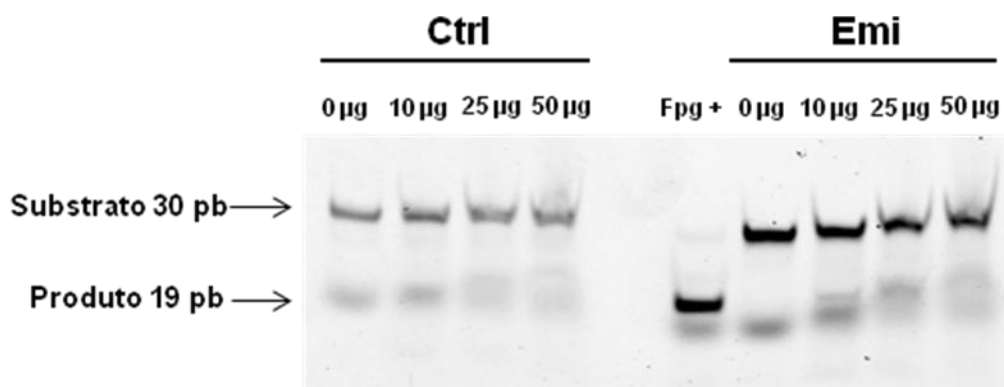


Figura 28. Medida da atividade de OGG1 em frações mitocondriais de cerebello humano em função da concentração de proteína. Para cada reação, foram utilizados 50 fmoles do duplex OG que foram incubados por 5 horas a 37°C em um banho com circulação de água. Foram utilizadas as seguintes concentrações de proteínas: 0 µg; 12,5 µg; 25 µg e 50 µg. A incubação com Proteinase K (0,25 mg/mL) e SDS 0,5% foi de 30 minutos a 55°C, além

disso, as amostras não foram precipitadas. **Ctrl** - 50 fmoles do duplex controle incubados com diferentes concentrações da fração; **Fpg⁺** - duplex OG incubados com a glicosilase comercial Fpg.

5. Discussão

O cérebro é considerado o órgão mais suscetível ao dano oxidativo devido ao fato de: i) apresentar alta concentração de ácidos graxos insaturados, que podem facilmente ser oxidados, ii) utilizar uma grande quantidade de oxigênio por unidade de peso (em torno de 20% do total utilizado pelo indivíduo), iii) possuir altas concentrações de ferro e ascorbato (importantes para a ocorrência da peroxidação lipídica) e iv) não ser particularmente enriquecido em defesas antioxidantes (Floyd, 1999). Além disso, outro fator que contribui para essa vulnerabilidade consiste no fato do neurônio ser uma célula pós-mitótica com limitada capacidade de regeneração (Bell, 2013).

Muitas evidências experimentais sugerem que a disfunção mitocondrial desempenha um papel central na patologia da DA, como: i) a identificação de alterações na morfologia mitocondrial; ii) redução na capacidade bioenergética, verificada pela redução na expressão de proteínas relacionadas à cadeia transportadora de elétrons, do potencial de membrana mitocondrial e da síntese de ATP; iii) alterações na distribuição e no tráfego mitocondrial, aumentando a degeneração sináptica; iv) acúmulo de lesões oxidadas no DNAm; v) bem como alterações na fissão e fusão mitocondrial (Chaturvedi e Beal, 2013). Lesões oxidadas em DNA podem resultar em eventos mutagênicos, e de fato, algumas das bases oxidadas encontradas aumentadas em DA, como 8-oxoGua, são mutagênicas *in vitro* e *in vivo*. Mutações no DNAm parecem, por sua vez, desempenhar um papel importante na disfunção mitocondrial verificada na DA, visto que um dos fatores que influenciam o desenvolvimento da DA esporádica é o acúmulo de mutações somáticas na região controle do DNAm, provavelmente resultantes de lesões formadas pelo aumento de EROs na mitocôndria, e não reparadas. Essa correlação foi experimentalmente verificada em córtex frontal de indivíduos com DA (Coskun et. al, 2004) .

Com base nessas afirmações, é fundamental entender como lesões acumulam em DNAm durante o desenvolvimento de DA, e quais os possíveis defeitos moleculares que podem causar esse acúmulo. O número de modificações presentes em DNA em qualquer dado momento é um balanço entre os eventos que levam à formação dessas lesões e a atividade das vias moleculares que removem ou reparam

as mesmas. Enquanto vários estudos já demonstraram que o número de bases de DNA oxidadas, principalmente 8-oxoGua, é maior em DNAmT de pacientes do que em indivíduos normais da mesma faixa etária (Mecocci et al., 1994; Wang et al., 2005), não está claro na literatura se esse efeito decorre do aumento da taxa de formação dessas modificações, ou de uma diminuição na taxa de remoção das mesmas.

Durante o processo de agregação de A β são gerados peróxido de hidrogênio e radical hidroxila, via reações com os íons Cu⁺ e Fe²⁺ (Mattson e Chan, 2003). O estudo de Huang et al. (1999b) mostrou que o Cu²⁺ é reduzido pelo peptídeo β A e que a interação cobre- β A reduz o oxigênio molecular a peróxido de hidrogênio sob condições de baixa tensão de O₂, situação semelhante ao parênquima cerebral. Além disso, também foi observado que a adição de Cu²⁺ e de β A em cultura de células neuronais primárias de ratos aumentou o efeito neurotóxico, com 70% de morte na presença de cobre e β A, contra 40% na presença somente de β A. Outro trabalho dos mesmos autores demonstrou que o complexo β A-Fe também aumenta a produção extracelular de peróxido de hidrogênio que, por sua vez, atravessa a membrana plasmática, aumentando a concentração de EROs intracelular (Huang et al. 1999a). Esse aumento de EROs induz a peroxidação lipídica da membrana, comprometendo a função de ATPases transportadoras de íons da membrana e os transportadores de glutamato, com consequente despolarização da membrana e redução dos níveis de ATP. Como resultado desse processo, ocorre o aumento da concentração intracelular de cálcio. A peroxidação lipídica também altera a homeostase de cálcio por meio de um mecanismo envolvendo a produção de 4-hidroxi-2,3-nonenal (HNE), um aldeído gerado como produto final das reações e rearranjos moleculares que ocorrem durante a cadeia de peroxidação lipídica. Esse aldeído também está relacionado com alterações da proteína tau, favorecendo sua hiperfosforilação (Mattson e Chan, 2003).

A concentração intracelular de cálcio desempenha um papel fundamental no controle de processos fisiológicos normais em vários tipos celulares, mas principalmente em células nervosas, onde tem como principais funções: o transporte e o controle da liberação de vesículas de neurotransmissores. Além disso, alterações na

concentração intracelular de cálcio promovem a síntese de ATP a partir da estimulação das enzimas do ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa. Por outro lado, alterações na homeostase intracelular de cálcio estão associadas à disfunção mitocondrial, com aumento na produção de EROs pela mitocôndria, e excitotoxicidade de glutamato (Adam-Vizi e Starkov, 2010). Esse aumento de EROs na mitocôndria torna o DNAm mais suscetível ao estresse oxidativo, com consequente formação de bases oxidadas. Dessa forma, é possível propor um cenário em que o acúmulo de A β extracelular resulta em estresse oxidativo intracelular, alterações na homeostase de cálcio, e consequentemente, estresse oxidativo mitocondrial. Com isso, o acúmulo de lesões oxidadas em DNAm causa alterações funcionais na fosforilação oxidativa, uma vez que este DNA codifica 13 proteínas componentes de 4 dos 5 complexos proteicos da fosforilação oxidativa. Ao fim, se estabelece um ciclo vicioso, no qual esse acúmulo de lesões resulta em maior produção de EROs pela mitocôndria, perpetuando o ciclo de formação de lesões e contribuindo para a progressão do estado patológico (Kowaltowski et al., 2009).

Por outro lado, poucos estudos investigaram alterações na atividade das vias moleculares que removem essas lesões, e, até a preparação desta dissertação, nenhum estudo investigando alterações em reparo de DNA em mitocôndrias de indivíduos acometidos pela doença de Alzheimer havia sido publicado. Um estudo anterior do nosso grupo, em colaboração com o grupo do Dr. Wilhelm A. Bohr, do *National Institute in Aging*, NIH, USA, utilizou extratos celulares totais de indivíduos cognitivamente normais, com comprometimento cognitivo leve (CCL) e pacientes DA, e observou uma diminuição bastante significativa da atividade de UDG e na atividade de BER total nos pacientes de DA, quando comparados com os indivíduos normais. Além disso, foi encontrada uma forte correlação negativa entre o estágio Braak e a atividade de BER nesses três grupos, o que levou à proposição de que a atividade de BER do indivíduo pode ser um fator de suscetibilidade importante para o desenvolvimento da patologia. Esse estudo, no entanto, não diferenciou as atividades de BER nuclear e mitocondrial.

Como o DNAm_t parece ser preferencialmente oxidado em DA, e a disfunção mitocondrial é um dos eventos celulares mais recorrentes em doenças neurodegenerativas, o presente estudo comparou, especificamente, as atividades de duas enzimas essenciais na via BER em extratos mitocondriais de indivíduos normais e DA. Além disso, incluiu-se outro grupo de indivíduos, os DA assintomáticos, que apresentam altas concentrações de placas e emaranhados, mas não apresentam comprometimento cognitivo. Esses indivíduos permitem testar a hipótese de que alta atividade de BER oferece proteção contra os efeitos deletérios dos marcadores neuropatológicos, diminuindo, portanto, os efeitos clínicos desses eventos moleculares.

Devido à grande complexidade fenotípica e fisiopatológica da demência, a clara categorização dos grupos experimentais quanto aos dados clínicos e patológicos é fundamental. Dentre as amostras selecionadas, três indivíduos estão fora do padrão das características exigidas pela sua classificação, e correspondem aos indivíduos do grupo de DA assintomático que apresentam demência mista, ou seja, a presença de mais de um tipo de neuropatologia, sendo que a mais frequente é a associação da demência vascular com a DA (Jellinger e Attems, 2007).

Apesar de existirem poucos estudos sobre demência mista, evidências apontam que em grupos de indivíduos com idade muito avançada, nos quais a ocorrência de DA é muito comum, existe uma frequência significativa de outras demências associadas (Schneider et al., 2009). Entretanto, a dificuldade de se determinar um limiar entre a DA pura e a demência mista, além da pouca disponibilidade de casos pertencentes ao grupo de DA assintomático, justificou a inclusão desses sujeitos na análise dos dados. Além disso, vale ressaltar que esses três indivíduos podem ser informativos para o estudo, uma vez que a cognição está preservada mesmo perante a existência de mais de um fator de lesão neuronal. Desta forma, esses indivíduos representariam um importante teste para a hipótese de que alterações na eficiência do reparo modulam o resultado clínico de alterações moleculares e celulares que resultam no acúmulo de indicadores neuropatológicos.

Dentre os fatores ambientais e de estilo de vida que podem modular a suscetibilidade ao desenvolvimento de DA, o número de anos de escolaridade parece desempenhar um papel importante. Estudos longitudinais com um grande número de sujeitos apontam que o alto nível educacional confere um efeito protetor contra o risco de desenvolvimento da DA (Sattler et al., 2012; Wilson et al., 2002). Nos indivíduos selecionados para este estudo, a média do nível de escolaridade do grupo de DA assintomático é maior do que o observado tanto para os indivíduos com DA quanto os normais. Entretanto, como não houve diferenças significativas entre o nível educacional nos três grupos e nem correlações entre as atividades enzimáticas e os anos de estudo, não se pode afirmar que, em nosso grupo experimental, a escolaridade atuou como um efeito protetor contra o desenvolvimento da DA. É importante ressaltar que o número amostral utilizado aqui foi pequeno, com grandes variações interindividuais. Desta forma, os nossos resultados, sozinhos, não são suficientes para descartar um efeito protetor da escolaridade sobre as manifestações clínicas da DA, ou qualquer associação desse critério com atividades de reparo de DNA mitocondrial.

Outro estudo aponta que as manifestações clínicas da DA em pacientes com elevado nível educacional são comparáveis às dos pacientes com baixo nível educacional e com menor frequência de achados neuropatológicos. A partir disso, foi proposto que os pacientes com mais anos de estudo possuem maior reserva cognitiva (Stern et al., 1992). O termo reserva cognitiva é definida como a capacidade de aperfeiçoar ou maximizar o desempenho cognitivo por meio do uso de diferentes redes cerebrais, refletindo na utilização de estratégias cognitivas alternativas (Stern et al., 2002). A partir desse conceito, pode-se propor que os indivíduos com DA assintomático teriam adquirido maior reserva cognitiva ao longo do processo de envelhecimento, permitindo dessa forma, tolerar maior grau de lesões sem desenvolver a doença. Nesse contexto, uma das hipóteses testadas seria de que atividade de reparo de DNA mais eficiente poderia contribuir para uma maior reserva cognitiva, uma vez que reduziria a quantidade de lesões cerebrais e, por conseguinte de dano cognitivo, permitindo assim,

maior flexibilidade na utilização de diferentes redes cerebrais. Esta racional justificou a inclusão do grupo assintomático no estudo.

A atividade da via de reparo por excisão de bases nas amostras experimentais foi medida utilizando ensaios *in vitro*, já muito bem validados na literatura. Para tanto, utilizou-se a metodologia descrita em Weissman et al. (2007) com a modificação de que a marcação radioativa dos substratos foi substituída pela marcação fluorescente. A utilização de fluoróforos ao invés de isótopos radioativos apresenta muitas vantagens, incluindo: i) a ausência de contaminação da área de manipulação, ii) não oferece riscos à saúde do executor, iii) não necessita de licença para o seu manuseio, iv) não gera lixo radioativo, que necessita de descarte específico, v) além de não apresentar decaimento do sinal emitido pelo fluoróforo (Anderson et al., 2008). Com isso, os ensaios *in vitro* não ficam restritos a serem realizados dentro do tempo de meia vida do radioisótopo, reduzindo assim o custo do substrato.

Uma vez que a marcação dos substratos e o processamento das amostras, em nosso caso para obter extratos mitocondriais altamente purificados, eram diferentes dos utilizados no estudo de Weissman e colaboradores (2007), foram realizadas padronizações das condições dos ensaios *in vitro* para medir as atividades das enzimas AP endonuclease e das DNA glicosilases UDG e OGG1. Em todos os casos, foi detectada atividade específica de cada enzima, como evidenciado pela existência de produto formado a partir da clivagem dos substratos específicos nas posições contendo as modificações, em extratos mitocondriais de cérebro humano. A presença das modificações específicas em cada substrato foi confirmada em ensaios utilizando enzimas recombinantes. Entretanto, a presença de bandas inespecíficas com o mesmo peso molecular do produto formado pela clivagem de OGG1 interfere na sua quantificação, sendo, portanto, necessária à realização de ensaios adicionais com a finalidade de retirar essas bandas.

A relação entre o nível funcional da via de reparo BER e a integridade das células nervosas, tanto no envelhecimento normal quanto na doença de Alzheimer, é sugerida em alguns estudos anteriores (Stevnsner et al., 2002; Weissman et al., 2007;

Weissman et al., 2009; Gredilla et al., 2012). O estudo de Weissman et al. (2009) comparou a atividade de BER em diferentes regiões cerebrais em dois grupos de camundongos transgênicos expressando as seguintes proteínas humanas: i) APP_{Swe}, a proteína precursora de A β com uma mutação (Glu693Gln) inicialmente identificada em casos de DA familiar em uma família sueca, e ii) 3xTgAD, que expressa a APP_{Swe}, a proteína tau e a presenilina-1 mutadas, modelo animal de DA muito utilizado em estudos fisiológicos e comportamentais. Também comparou os dois modelos de camundongos em fase pré-sintomática (3 meses) e sintomática (10 meses). Os resultados obtidos nesse estudo mostraram que as atividades de incisão de 8-oxoGua, de 5-OH-C e de uracila não apresentaram alterações nas regiões cerebrais associadas a DA. Outro estudo mostrou que frações sinaptossomais do camundongo transgênico 3xTgAD também não apresentaram alterações na atividade de BER, porém redução tanto da atividade quanto da expressão das enzimas da via BER mitocondrial foram verificadas em ratos normais com idade avançada (Gredilla et al., 2012). Uma vez que os resultados obtidos nos modelos murinos diferem dos resultados obtidos em cérebros humanos, os dois estudos sugerem que a preservação da via BER impede a morte das células nervosas resultante do acúmulo das placas e dos emaranhados, justificando assim a ausência de morte neuronal observada nos modelos animais de DA.

Os resultados apresentados no presente estudo ainda não podem ser interpretados com rigor, uma vez que o número de amostras analisadas para cada grupo experimental é limitado. No entanto, sugerem que as atividades de APE1 no cerebelo do grupo DA assintomático estão elevadas, significativamente, em relação ao grupo controle e ao grupo DA. A atividade do grupo DA foi equivalente à do grupo controle, o que corrobora com os resultados obtidos em extrato celular total (Weissman et al., 2007). Por outro lado, em córtex temporal os três grupos apresentaram níveis de atividade equivalentes, porém com valores menores aos medidos no cerebelo.

A enzima APE1 exerce um papel muito importante na viabilidade celular quando a célula é exposta ao estresse oxidativo. Cultura de células HeLa submetidas a baixas doses de HClO apresentaram um aumento significativo nos níveis de RNAm de

APE1, tornando-se mais resistentes a um segundo tratamento com agentes oxidativos. Os autores sugeriram que o aumento de APE1 induzido por EROs torna as células mais resistentes devido ao aumento da atividade de reparo de sítios abásicos e de quebras de fitas simples por meio da via BER. Esse fenômeno foi denominado como “resposta adaptativa” (Ramana et al., 1998). Já o estudo de Li et al. (2012) mostrou que, em resposta ao estresse oxidativo, a enzima APE1 nuclear altera a expressão de genes mitocondriais codificados no núcleo por meio de um controle redox de NRF1 (*Nuclear respiratory factor 1*), fator de transcrição relacionado a regulação mitocondrial, sugerindo que essa interação pode aumentar os níveis mitocondriais de APE1 e elevar a atividade de reparo do DNAm.

Em células primárias de hipocampo e de neurônios sensoriais de ratos adultos, a enzima APE1 está envolvida na prevenção da neurotoxicidade. A superexpressão da enzima selvagem e de um mutante deficiente na atividade redox, mas competente na atividade de reparo (*Ape1-C65A*), resultou na proteção contra o dano oxidativo gerado por meio da exposição ao H₂O₂. Nas células *Ape1-C65A* a proteção atingiu níveis intermediários, o que levou a conclusão de que tanto a função de reparo quanto a função redox de APE1 são importantes para a sobrevivência neuronal (Vasko et al., 2005).

Com base no envolvimento de APE1 na prevenção da neurotoxicidade causada por dano oxidativo, poderíamos especular que a alta atividade de APE1 observada no cerebelo do grupo com DA assintomático protege as células nervosas contra os insultos gerados pelo acúmulo das placas e dos emaranhados, restringindo dessa forma, o desenvolvimento do quadro clínico. Já no grupo com DA, a menor atividade APE1, em relação ao grupo assintomático, tornaria as células mais suscetíveis ao dano oxidativo, o que pode ser um dos fatores determinantes na progressão da doença. Entretanto, no córtex temporal, observou-se que a atividade de APE1 não varia entre os três grupos e apresenta valores de incisão menores do que os observados no cerebelo, indicando dessa forma, que regiões cerebrais apresentam suscetibilidade distinta aos eventos moleculares desencadeados durante o

desenvolvimento da doença. A menor atividade basal de APE1 em córtex poderia contribuir para o fato de que essa região apresenta intensa morte neuronal em DA enquanto o cerebelo é mais preservado, mesmo em situações em que ambas as regiões estivessem sujeitas à formação de placas e emaranhados.

Por outro lado, a atividade de UDG está significativamente reduzida em indivíduos com DA nas duas regiões cerebrais testadas. Em cerebelo, tanto o grupo DA quanto o grupo DA assintomático apresentaram atividade enzimática reduzida quando comparados ao grupo controle. Resultados similares também foram observados em extratos celulares totais de cerebelo por Weissman et al. (2007), bem como a redução nos níveis da expressão proteica dessa enzima. Já no córtex temporal, a atividade de UDG foi significativamente menor em DA quando comparada tanto com o grupo controle quanto com o grupo assintomático. Este resultado sugere que a atividade de UDG pode, através de mecanismos ainda não identificados, determinar o resultado clínico das lesões neuropatológicas observadas tanto nos indivíduos sintomáticos quanto nos assintomáticos.

A enzima UDG exerce um papel fundamental na manutenção da viabilidade de células nervosas, visto que a ausência de expressão dessa enzima induz apoptose em cultura de células neuronais de hipocampo de ratos (Kruman et al., 2004). Além disso, a análise da expressão de UDG em resposta ao estresse oxidativo mostrou respostas diferentes quanto às isoformas nuclear e mitocondrial. Ao comparar a expressão gênica (RNAm) de UDG em células HeLa na presença e na ausência de peróxido de hidrogênio, observou-se um aumento de 2,2 vezes da expressão da UDG mitocondrial em células expostas enquanto que não houve alteração na expressão da UDG nuclear. Os autores sugerem que esse aumento na expressão de UDG mitocondrial exerce um papel importante na defesa contra o estresse oxidativo (Akbari et al., 2007), o que suportaria o fato desta enzima ser importante para a manutenção da viabilidade neuronal, uma vez que essas células estão constantemente expostas à condições oxidantes.

Estudos epidemiológicos relacionam elevadas concentrações de homocisteína no plasma sanguíneo ao risco de desenvolvimento de DA, uma vez que a homocisteína é um indicativo de deficiência de ácido fólico na dieta que altera as funções cognitivas por meio de alterações em reações de metilação (Ravaglia et al., 2005; Seshadri et al., 2002). O ácido fólico ou folato, importante doador de grupos metil, é essencial também para a integridade genômica, visto que sua deficiência leva a incorporação aumentada de uracilas em DNA, que, por sua vez, podem desencadear a formação de outras lesões em DNA, resultantes de processamento incompleto das uracilas, ou podem funcionar como sinal para a indução de processos de morte celular (Hinterberger e Fischer, 2013). Kruman et al. (2002) verificou que células primárias neuronais mantidas em um meio deficiente em ácido fólico apresentaram um aumento da vulnerabilidade à toxicidade do peptídeo β A em relação ao controle. Ademais, esse estudo mostrou que neurônios do hipocampo de camundongos expressando APP_{Swe} exibiram maior vulnerabilidade ao acúmulo de lesões em DNA e/ou excitotoxicidade quando mantidos em uma dieta deficiente em folato, sugerindo que essa vulnerabilidade está associada à redução do reparo de DNA.

Baseado nessas informações, a redução da atividade de UDG verificada nos grupos DA assintomático e DA pode comprometer a viabilidade das células nervosas, visto que a deficiência do reparo de uracilas torna essas células mais suscetíveis à toxicidade das placas neuríticas e ao estresse oxidativo. No córtex temporal, a redução da atividade de UDG foi mais significativa no grupo DA, sugerindo que o grupo assintomático poderia apresentar vantagens na proteção contra as lesões características da DA por possuir maior atividade dessa DNA glicosilase. Entretanto, essas conclusões precisam ser suportadas por dados adicionais, como a análise da expressão das proteínas de reparo de DNA, bem como o aumento do número de indivíduos dos grupos experimentais.

A correlação entre a atividade de UDG e os critérios neuropatológicos revelaram resultados importantes para a compreensão da fisiopatologia da demência. A correlação entre o critério de Braak e a atividade de UDG apresentou-se

significativamente negativa na região do cerebelo e não significativa no córtex temporal ($p=0,07$). No trabalho de Weissman et al. (2007) também foi observada uma correlação negativa significativa entre a atividade de UDG e o estágio de Braak, o que levou os autores a especular que a perda da eficiência da atividade de reparo pela via BER aumenta a suscetibilidade das células nervosas aos efeitos das placas e dos emaranhados, permitindo assim, o desenvolvimento da doença. Nossos dados confirmam e expandem essa hipótese, sugerindo ainda que, a atividade de UDG pode ser determinante no estado cognitivo durante o desenvolvimento da doença. Além disso, sugerem que o reparo de uracilas em DNAm pode ter um papel fundamental no mecanismo fisiopatológico, o que não foi identificado no estudo anterior.

Com relação ao CERAD, a atividade de UDG e esse critério apresentaram correlações negativas nas duas regiões analisadas, sugerindo uma tendência a ser significativa no cerebelo ($p=0,08$). Em extrato total, Weissman e colaboradores (2007) não encontraram correlação entre o número de placas neuríticas e a atividade de UDG. Essa diferença entre os dois estudos pode ser um indicativo de que as proteínas de reparo de DNA mitocondrial estão mais correlacionadas aos achados neuropatológicos do que as proteínas de extrato total, uma vez que a mitocôndria, por exercer um papel central na sobrevivência das células nervosas, apresenta inúmeras modificações morfológicas e funcionais decorrentes do processo de desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, como a DA.

Portanto, o presente estudo é de suma importância para a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na doença de Alzheimer, visto que mostrou diferenças nas atividades de duas importantes enzimas da via BER, APE1 e UDG, em extratos mitocondriais tanto de indivíduos com DA quanto em indivíduos que apresentam uma proteção contra as lesões neuronais. Além disso, as diferenças encontradas nas alterações de atividade de reparo entre o cerebelo e o córtex temporal, região ligada à fisiopatologia da doença, sugerem que diferenças basais entre as regiões cerebrais, bem como na eficiência das atividades de reparo, podem, em última instância, serem determinantes importantes na suscetibilidade de uma determinada

região ao desenvolvimento de alterações funcionais características do quadro patológico.

6. Conclusões

Os resultados obtidos nesse estudo permitem concluir que:

- A metodologia desenvolvida, na qual oligonucleotídeos marcados com fluoróforos são utilizados como substratos para verificar a atividade das enzimas da via BER, mostrou-se eficiente na detecção dos produtos formados pela reação enzimática em extratos mitocondriais de cérebros humanos;
- A atividade da enzima AP endonuclease apresentou níveis significativamente elevados nos extratos mitocondriais de cerebelo do grupo DA assintomático, indicando que a preservação dessa enzima pode proteger contra as lesões geradas a partir do acúmulo de placas e emaranhados, retardando a manifestação clínica dessa doença;
- No córtex temporal, a atividade de APE1 não apresentou variação entre os três grupos analisados, porém a média da taxa de incisão foi menor do que o observado no cerebelo, indicando que as regiões cerebrais apresentam suscetibilidade diferente aos danos decorrentes do desenvolvimento da doença;
- As correlações entre a atividade de APE1 e os critérios neuropatológicos mostraram-se positivas e fracas nas duas regiões encefálicas, o que indica que a concentração das placas e dos emaranhados não exerce influência nessa atividade enzimática;
- A atividade da uracil-DNA glicosilase apresentou-se significativamente diminuída nos extratos mitocondriais de cerebelo tanto no grupo DA assintomático quanto no grupo DA, o que pode comprometer a viabilidade neuronal, tornando essas células mais propensas ao dano. Esse resultado está em acordo com resultados apresentados por Weissman et al. (2007) em que foi observado uma redução da atividade de UDG em extrato total de cerebelo de indivíduos com DA.
- No córtex temporal, os níveis da atividade de UDG foram significativamente menores no grupo DA, indicando que os indivíduos com DA assintomático apresentam um grau de preservação dessa DNA glicosilase, o que pode contribuir para o retardo do desenvolvimento da doença.

- A correlação negativa entre a atividade de UDG e o critério de Braak no cerebelo e no córtex temporal sugere que deficiências da via de reparo BER podem aumentar a suscetibilidade das células nervosas à ação tóxica dos emaranhados neurofibrilares.
- A atividade de UDG e o critério CERAD apresentaram uma correlação negativa nas duas regiões encefálicas, possuindo uma tendência a ser significativa no cerebelo. Isso indica que esta atividade pode estar envolvida na proteção contra a ação citotóxica de placas neuríticas.

7. Referências Bibliográficas



1. American Psychiatric Association: *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* Fourth ed. Washington, D.C. : American Psychiatric Association; 1994.
2. Adam-Vizi V, Starkov AA. Calcium and mitochondrial reactive oxygen species generation: how to read the facts. *J Alzheimers Dis.* 2010;20 Suppl 2:S413-26.
3. Akbari M, Otterlei M, Pena-Diaz J, Krokan HE. Different organization of base excision repair of uracil in DNA in nuclei and mitochondria and selective upregulation of mitochondrial uracil-DNA glycosylase after oxidative stress. *Neuroscience.* 2007 Apr 14;145(4):1201-12.
4. Aller P, Rould MA, Hogg M, Wallace SS, Doublet S. A structural rationale for stalling of a replicative DNA polymerase at the most common oxidative thymine lesion, thymine glycol. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Jan 16;104(3):814-8.
5. Alzheimer A, Stelzmann RA, Schnitzlein HN, Murtagh FR. An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". *Clin Anat.* 1995;8(6):429-31.
6. Anderson BJ, Larkin C, Guja K, Schildbach JF. Using fluorophore-labeled oligonucleotides to measure affinities of protein-DNA interactions. *Methods Enzymol.* 2008;450:253-72.
7. Baki L, Shioi J, Wen P, Shao Z, Schwarzman A, Gama-Sosa M, et al. PS1 activates PI3K thus inhibiting GSK-3 activity and tau overphosphorylation: effects of FAD mutations. *EMBO J.* 2004 Jul 7;23(13):2586-96.
8. Bell KF. Insight into a neuron's preferential susceptibility to oxidative stress. *Biochem Soc Trans.* 2013 Dec 1;41(6):1541-5.
9. Bennett DA, Schneider JA, Arvanitakis Z, Kelly JF, Aggarwal NT, Shah RC, et al. Neuropathology of older persons without cognitive impairment from two community-based studies. *Neurology.* 2006 Jun 27;66(12):1837-44.
10. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 1991;82(4):239-59.
11. Consensus recommendations for the postmortem diagnosis of Alzheimer's disease. The National Institute on Aging, and Reagan Institute Working Group on Diagnostic Criteria for the Neuropathological Assessment of Alzheimer's Disease. *Neurobiol Aging.* 1997 Jul-Aug;18(4 Suppl):S1-2.
12. Canugovi C, Misiak M, Ferrarelli LK, Croteau DL, Bohr VA. The role of DNA repair in brain related disease pathology. *DNA Repair (Amst).* 2013 Aug;12(8):578-87.

13. Chattopadhyay R, Wiederhold L, Szczesny B, Boldogh I, Hazra TK, Izumi T, et al. Identification and characterization of mitochondrial abasic (AP)-endonuclease in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(7):2067-76.
14. Chaturvedi RK, Flint Beal M. Mitochondrial diseases of the brain. *Free Radic Biol Med.* 2013 Oct;63:1-29.
15. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* 2003 Jul;17(10):1195-214.
16. Coskun PE, Beal MF, Wallace DC. Alzheimer's brains harbor somatic mtDNA control-region mutations that suppress mitochondrial transcription and replication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jul 20;101(29):10726-31.
17. de Souza-Pinto NC, Wilson DM, 3rd, Stevnsner TV, Bohr VA. Mitochondrial DNA, base excision repair and neurodegeneration. *DNA Repair (Amst).* 2008 Jul 1;7(7):1098-109.
18. Dizdaroglu M, Kirkali G, Jaruga P. Formamidopyrimidines in DNA: mechanisms of formation, repair, and biological effects. *Free Radic Biol Med.* 2008 Dec 15;45(12):1610-21.
19. Evans DA, Funkenstein HH, Albert MS, Scherr PA, Cook NR, Chown MJ, et al. Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons. Higher than previously reported. *JAMA.* 1989 Nov 10;262(18):2551-6.
20. Fischer O. Miliare Nekrosen mit Drusigen Wucherungen der Neurofibrillen, eine Regelmässige Veränderung der Hirnrinde bei Seniler Demenz. *M Schr Psychiat Neurol.* 1907;22:361-72.
21. Floyd RA. Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1999 Dec;222(3):236-45.
22. Gellerstedt N. Zur Kenntnis der Hirnveränderungen bei der Normalen Altersinvolution. *Uppsala Lak Foren Forrh.* 1933;38:193-408.
23. Graves AB, Larson EB, Edland SD, Bowen JD, McCormick WC, McCurry SM, et al. Prevalence of dementia and its subtypes in the Japanese American population of King County, Washington state. The Kame Project. *Am J Epidemiol.* 1996 Oct 15;144(8):760-71.
24. Gredilla R, Weissman L, Yang JL, Bohr VA, Stevnsner T. Mitochondrial base excision repair in mouse synaptosomes during normal aging and in a model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2012 Apr;33(4):694-707.

25. Grinberg LT, Ferretti RE, Farfel JM, Leite R, Pasqualucci CA, Rosemberg S, et al. Brain bank of the Brazilian aging brain study group - a milestone reached and more than 1,600 collected brains. *Cell Tissue Bank*. 2007;8(2):151-62.
26. Halliwell B, Aruoma OI. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett*. 1991 Apr 9;281(1-2):9-19.
27. Harris ME, Hensley K, Butterfield DA, Leedle RA, Carney JM. Direct evidence of oxidative injury produced by the Alzheimer's beta-amyloid peptide (1-40) in cultured hippocampal neurons. *Exp Neurol*. 1995 Feb;131(2):193-202.
28. Hendrie HC, Osuntokun BO, Hall KS, Ogunniyi AO, Hui SL, Unverzagt FW, et al. Prevalence of Alzheimer's disease and dementia in two communities: Nigerian Africans and African Americans. *Am J Psychiatry*. 1995 Oct;152(10):1485-92.
29. Hinterberger M, Fischer P. Folate and Alzheimer: when time matters. *J Neural Transm*. 2013 Jan;120(1):211-24.
30. Huang X, Atwood CS, Hartshorn MA, Multhaup G, Goldstein LE, Scarpa RC, et al. The A beta peptide of Alzheimer's disease directly produces hydrogen peroxide through metal ion reduction. *Biochemistry*. 1999 Jun 15;38(24):7609-16.
31. Huang X, Cuajungco MP, Atwood CS, Hartshorn MA, Tyndall JD, Hanson GR, et al. Cu(II) potentiation of Alzheimer's beta-amyloid neurotoxicity. Correlation with cell-free hydrogen peroxide production and metal reduction. *J Biol Chem*. 1999 Dec 24;274(52):37111-6.
32. Hy LX, Keller DM. Prevalence of AD among whites: a summary by levels of severity. *Neurology*. 2000 Jul 25;55(2):198-204.
33. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 2009 [cited 2013 02 de dezembro]; Available from: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/indic_sociosaude/2009/indic_saude.pdf
34. Iida T, Furuta A, Nishioka K, Nakabeppu Y, Iwaki T. Expression of 8-oxoguanine DNA glycosylase is reduced and associated with neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathol*. 2002 Jan;103(1):20-5.
35. Imam SZ, Karahalil B, Hogue BA, Souza-Pinto NC, Bohr VA. Mitochondrial and nuclear DNA-repair capacity of various brain regions in mouse is altered in an age-dependent manner. *Neurobiol Aging*. 2006 Aug;27(8):1129-36.

36. Iqbal K, Liu F, Gong CX, Alonso Adel C, Grundke-Iqbal I. Mechanisms of tau-induced neurodegeneration. *Acta Neuropathol.* 2009 Jul;118(1):53-69.
37. Isella V, Villa L, Russo A, Regazzoni R, Ferrarese C, Appollonio IM. Discriminative and predictive power of an informant report in mild cognitive impairment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2006 Feb;77(2):166-71.
38. Jellinger KA, Attems J. Neuropathological evaluation of mixed dementia. *J Neurol Sci.* 2007 Jun 15;257(1-2):80-7.
39. Jorm AF, Jacomb PA. The Informant Questionnaire on Cognitive Decline in the Elderly (IQCODE): socio-demographic correlates, reliability, validity and some norms. *Psychol Med.* 1989 Nov;19(4):1015-22.
40. Jorm AF, Korten AE, Henderson AS. The prevalence of dementia: a quantitative integration of the literature. *Acta Psychiatr Scand.* 1987 Nov;76(5):465-79.
41. Karahalil B, Hogue BA, de Souza-Pinto NC, Bohr VA. Base excision repair capacity in mitochondria and nuclei: tissue-specific variations. *FASEB J.* 2002 Dec;16(14):1895-902.
42. Kavli B, Sundheim O, Akbari M, Otterlei M, Nilsen H, Skorpen F, et al. hUNG2 is the major repair enzyme for removal of uracil from U:A matches, U:G mismatches, and U in single-stranded DNA, with hSMUG1 as a broad specificity backup. *J Biol Chem.* 2002 Oct 18;277(42):39926-36.
43. Klungland A, Lindahl T. Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1). *EMBO J.* 1997 Jun 2;16(11):3341-8.
44. Knopman DS, Parisi JE, Salviati A, Floriach-Robert M, Boeve BF, Ivnik RJ, et al. Neuropathology of cognitively normal elderly. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2003 Nov;62(11):1087-95.
45. Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.* 2009 Aug 15;47(4):333-43.
46. Kruman, II, Kumaravel TS, Lohani A, Pedersen WA, Cutler RG, Kruman Y, et al. Folic acid deficiency and homocysteine impair DNA repair in hippocampal neurons and sensitize them to amyloid toxicity in experimental models of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2002 Mar 1;22(5):1752-62.

47. Kruman, II, Schwartz E, Kruman Y, Cutler RG, Zhu X, Greig NH, et al. Suppression of uracil-DNA glycosylase induces neuronal apoptosis. *J Biol Chem*. 2004 Oct 15;279(42):43952-60.
48. Li M, Vascotto C, Xu S, Dai N, Qing Y, Zhong Z, et al. Human AP endonuclease/redox factor APE1/ref-1 modulates mitochondrial function after oxidative stress by regulating the transcriptional activity of NRF1. *Free Radic Biol Med*. 2012 Jul 15;53(2):237-48.
49. Lovell MA, Markesbery WR. Oxidative DNA damage in mild cognitive impairment and late-stage Alzheimer's disease. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(22):7497-504.
50. Lovell MA, Xie C, Markesbery WR. Decreased base excision repair and increased helicase activity in Alzheimer's disease brain. *Brain Res*. 2000 Feb 7;855(1):116-23.
51. Mattson MP. Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol Rev*. 1997 Oct;77(4):1081-132.
52. Mattson MP. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature*. 2004 Aug 5;430(7000):631-9.
53. Mattson MP, Chan SL. Neuronal and glial calcium signaling in Alzheimer's disease. *Cell Calcium*. 2003 Oct-Nov;34(4-5):385-97.
54. McCullough AK, Sanchez A, Dodson ML, Marapaka P, Taylor JS, Lloyd RS. The reaction mechanism of DNA glycosylase/AP lyases at abasic sites. *Biochemistry*. 2001 Jan 16;40(2):561-8.
55. Mecocci P, MacGarvey U, Beal MF. Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 1994 Nov;36(5):747-51.
56. Mecocci P, MacGarvey U, Kaufman AE, Koontz D, Shoffner JM, Wallace DC, et al. Oxidative damage to mitochondrial DNA shows marked age-dependent increases in human brain. *Ann Neurol*. 1993 Oct;34(4):609-16.
57. Moro ML, Collins MJ, Cappellini E. Alzheimer's disease and amyloid beta-peptide deposition in the brain: a matter of 'aging'? *Biochem Soc Trans*. 2010 Apr;38(2):539-44.
58. Morris JC. The Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules. *Neurology*. 1993 Nov;43(11):2412-4.
59. Morris JC, McKeel DW, Jr., Storandt M, Rubin EH, Price JL, Grant EA, et al. Very mild Alzheimer's disease: informant-based clinical, psychometric, and pathologic distinction from normal aging. *Neurology*. 1991 Apr;41(4):469-78.

60. Morris JC, Mohs RC, Rogers H, Fillenbaum G, Heyman A. Consortium to establish a registry for Alzheimer's disease (CERAD) clinical and neuropsychological assessment of Alzheimer's disease. *Psychopharmacol Bull.* 1988;24(4):641-52.
61. Oroboros Instruments. Laboratory Protocol Citrate Synthase Mitochondrial Marker Enzyme. [cited 2013 11/12]; Available from: http://www.orooboros.at/fileadmin/user_upload/Protocols/MiPNet08.14_CitrateSynthase.pdf
62. Petermann E, Ziegler M, Oei SL. ATP-dependent selection between single nucleotide and long patch base excision repair. *DNA Repair (Amst).* 2003 Oct 7;2(10):1101-14.
63. Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E. Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. *Arch Neurol.* 1999 Mar;56(3):303-8.
64. Ramana CV, Boldogh I, Izumi T, Mitra S. Activation of apurinic/aprimidinic endonuclease in human cells by reactive oxygen species and its correlation with their adaptive response to genotoxicity of free radicals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Apr 28;95(9):5061-6.
65. Ravaglia G, Forti P, Maioli F, Martelli M, Servadei L, Brunetti N, et al. Homocysteine and folate as risk factors for dementia and Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr.* 2005 Sep;82(3):636-43.
66. Robertson AB, Klungland A, Rognes T, Leiros I. DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it. *Cell Mol Life Sci.* 2009 Mar;66(6):981-93.
67. Roth M, Tomlinson BE, Blessed G. Correlation between scores for dementia and counts of 'senile plaques' in cerebral grey matter of elderly subjects. *Nature.* 1966;209:109-10.
68. Ryan NS, Rossor MN. Correlating familial Alzheimer's disease gene mutations with clinical phenotype. *Biomark Med.* 2010 Feb;4(1):99-112.
69. Sattler C, Toro P, Schonknecht P, Schroder J. Cognitive activity, education and socioeconomic status as preventive factors for mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Psychiatry Res.* 2012 Mar 30;196(1):90-5.
70. Schmitt FA, Davis DG, Wekstein DR, Smith CD, Ashford JW, Markesbery WR. "Preclinical" AD revisited: neuropathology of cognitively normal older adults. *Neurology.* 2000 Aug 8;55(3):370-6.

71. Schneider JA, Arvanitakis Z, Leurgans SE, Bennett DA. The neuropathology of probable Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Ann Neurol*. 2009 Aug;66(2):200-8.
72. Seshadri S, Beiser A, Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, D'Agostino RB, et al. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2002 Feb 14;346(7):476-83.
73. Shibutani S, Bodepudi V, Johnson F, Grollman AP. Translesional synthesis on DNA templates containing 8-oxo-7,8-dihydrodeoxyadenosine. *Biochemistry*. 1993 May 4;32(17):4615-21.
74. Steiner H, Fluhrer R, Haass C. Intramembrane proteolysis by gamma-secretase. *J Biol Chem*. 2008 Oct 31;283(44):29627-31.
75. Stern Y. What is cognitive reserve? Theory and research application of the reserve concept. *J Int Neuropsychol Soc*. 2002 Mar;8(3):448-60.
76. Stern Y, Alexander GE, Prohovnik I, Mayeux R. Inverse relationship between education and parietotemporal perfusion deficit in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 1992 Sep;32(3):371-5.
77. Stevnsner T, Thorslund T, de Souza-Pinto NC, Bohr VA. Mitochondrial repair of 8-oxoguanine and changes with aging. *Exp Gerontol*. 2002 Oct-Nov;37(10-11):1189-96.
78. Vasko MR, Guo C, Kelley MR. The multifunctional DNA repair/redox enzyme Ape1/Ref-1 promotes survival of neurons after oxidative stress. *DNA Repair (Amst)*. 2005 Mar 2;4(3):367-79.
79. Wang J, Xiong S, Xie C, Markesbery WR, Lovell MA. Increased oxidative damage in nuclear and mitochondrial DNA in Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 2005 May;93(4):953-62.
80. Weissman L, de Souza-Pinto NC, Mattson MP, Bohr VA. DNA base excision repair activities in mouse models of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2009 Dec;30(12):2080-1.
81. Weissman L, Jo DG, Sorensen MM, de Souza-Pinto NC, Markesbery WR, Mattson MP, et al. Defective DNA base excision repair in brain from individuals with Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(16):5545-55.
82. Wilson DM, 3rd, Bohr VA. The mechanics of base excision repair, and its relationship to aging and disease. *DNA Repair (Amst)*. 2007 Apr 1;6(4):544-59.

83. Wilson RS, Mendes De Leon CF, Barnes LL, Schneider JA, Bienias JL, Evans DA, et al. Participation in cognitively stimulating activities and risk of incident Alzheimer disease. JAMA. 2002 Feb 13;287(6):742-8.

84. Wilson SH, Kunkel TA. Passing the baton in base excision repair. Nat Struct Biol. 2000 Mar;7(3):176-8.

8. Anexos

DIRETORIA CLÍNICA

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 16.06.04, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **285/04**, intitulado: "Correlação Anátomo-Funcional das Alterações Cerebrais no Envelhecimento: Um estudo quantitativo em material de necrópsia" apresentado pelo Departamento de **PATOLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Pesquisador(a) Responsável: Prof. Dr. Wilson Jacob Filho

Pesquisador(a) Executante: Dra. Lea Tenenholz Grinberg

CAPPesq, 16 de Junho de 2004.



PROF. DR. CLAUDIO LEONE

Vice-Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

OBSERVAÇÃO: Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c")



Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Caixa Postal
8090 – São Paulo, Brasil.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE:.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO : .M . F . DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº
APTO: BAIRRO:
CIDADE:
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE
:.....SEXO: M . F . DATA NASCIMENTO.:/...../..... ENDEREÇO:
Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD
(.....)

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: CORRELAÇÃO ANÁTOMO -FUNCIONAL DAS ALTERAÇÕES CEREBRAIS NO ENVELHECIMENTO: *Um estudo quantitativo em material de necropsia*

2. PESQUISADOR: Lea Tenenholz Grinberg CARGO/FUNÇÃO: Médica-pesquisadora
INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 105290 UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Patologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO X. RISCO MÍNIMO . RISCO MÉDIO . RISCO BAIXO . RISCO MAIOR .

III -REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE

LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

Muito obrigada por sua atenção.

Estamos realizando um estudo para identificar como o envelhecimento ocorre no cérebro. Este estudo é muito importante porque ainda não sabemos direito porque as pessoas têm demência ou ficam mais esquecidas ou tremendo. Este trabalho também irá ajudar a descobrir a causa de morte de seu parente. Tratamentos novos para as doenças só são descobertos fazendo estudos como este.

Este estudo irá funcionar da seguinte maneira:

O(a) Senhor(a) será entrevistado por um enfermeiro (a) à respeito de seu parente que faleceu. As perguntas são simples, porém é importante que o(a) senhor(a) pense por dois minutos antes de responder e que seja o mais exato possível. Caso não saiba a resposta, diga “não sei”.

Durante a autópsia serão amostrados fragmentos de sistema nervoso central e de órgãos, cujo comprometimento podem afetar a função cerebral, incluindo: coração, rim e carótidas, além de amostras de sangue. Todos os materiais serão analisados com bastante cuidado e armazenados para estudos futuros nas áreas de anatomia, bioquímica, genética e imagem. Os resultados serão comparados com as respostas que o(a) senhor(a) respondeu. Não será feito nada a mais que o procedimento normal da autópsia e a aparência externa do corpo não será alterada.

Com sua colaboração, poderemos saber se existiam alterações no cérebro de seu familiar que pudessem ser responsáveis por provocar doenças. Desta forma, outras pessoas poderão ser beneficiadas por conhecermos melhor doenças com Alzheimer e mal de Parkinson. Algumas das doenças passam de pai para filho e, além disso, podem afetar grande parte da população. Então, os resultados que conseguiremos poderão ajudar muitas pessoas a não ficarem doentes.

Não há nenhum risco neste estudo, porque o(a) senhor(a) não precisará voltar aqui novamente e este estudo não atrasará a realização da autópsia.

IV -ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

Qualquer dúvida que o(a) senhor(a) tenha será esclarecida pela própria médica responsável pelo trabalho, os resultados estarão disponíveis somente a(o) senhor(a). A qualquer momento, se for sua vontade, o seu familiar pode ser retirado da pesquisa e todas as informações obtidas serão sigilosas. Uma cópia deste documento será entregue a(o) senhor(a)

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO

A responsável pela pesquisa em caso de dúvidas é, Dra. Lea Tenenholz Grinberg CRM-SP: 105290 Telefone: (011) 3066 7322

VI -CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de 200 . Horário do término: _____

assinatura do participante da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador (carimbo ou nome Legível)