ADERBAL RUY TEODORO DA SILVA

**Avaliação da expressão gênica na doença de Alzheimer
através da técnica de cDNA *microarray* em amostras de
cérebro *postmortem* humano**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Helena Brentani

São Paulo

2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Aderbal Ruy Teodoro da

Avaliação da expressão gênica na doença de Alzheimer através da técnica de *cDNA microarray* em amostras de cérebro *postmortem* humano / Aderbal Ruy Teodoro da Silva. -- São Paulo, 2008.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Helena Brentani.

Descritores: 1.Doença de Alzheimer 2.Expressão gênica 3.Envelhecimento 4.Cérebro/patologia 5.Demência

USP/FM/SBD-404/08

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Aderbal e Diná, pelo amor, apoio e desejo de me ver vencer.

Agradecimentos

À Deus, por mais uma vitória.

Aos meus pais e minha irmã, pelo apoio incondicional, e que apesar da distância estiveram torcendo por mim.

À minha orientadora Helena Brentani, pela confiança e apoio dispensados desde a minha iniciação científica até agora, e, também, nos próximos anos.

À minha co-orientadora Dirce M. Carraro, por ter me recebido de braços abertos em seu laboratório e pelo apoio.

Aos integrantes do GEROLAB e do Banco de Cérebros da FMUSP. Em especial à Dra. Lea Grinberg, por possibilitar minha entrada no grupo; ao Dr. José Farfel e a Renata Leite pela ajuda na obtenção dos casos; e todos que me ajudaram de alguma forma.

À todos os integrantes e ex-integrantes do BIMOCA, minha segunda casa. Louise, Heloísa (Ling-Ling), Maria Cristina, Nádia, Sabrina (Lady Felícia), Elen, Thiago, Mev, Mariana, Elisa, Vera, Gustavo, Paulo, Waleska, Wilson, Jane, Bruna, Carol (Bozena), Bianca, Alexandre, Felipe, Adriana, Laura, Fábio. Obrigado por todos os bons momentos.

À todos os meus amigos. Em especial, à Aline Simas Personal, pela convivência e amizade; à Priscila Negraes, que apesar de um pouco distante, a amizade permanece; à Priscila (Ixa), pelos conselhos sábios, pelas baladinhas e pela amizade; à Adriana (Xarms), que apesar de desaparecer, foi muito importante durante minha estadia em São Paulo; e ao Thiago, um grande amigo, obrigado por tudo.

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Sumário

Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Lista de siglas	
Resumo	
Summary	
1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Histórico dos critérios neuropatológicos para o diagnóstico da DA	13
1.2 Características anatomopatológicas da DA	17
1.3 Biologia Molecular.....	24
2 OBJETIVOS.....	30
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS	32
3.1 Amostras.....	32
3.2 Extração de RNA total	37
3.3 Amplificação de RNA mensageiro	42
3.4 Microarranjos de cDNA (<i>cDNA microarrays</i>).....	47
3.5 Marcação e Hibridização	49
3.6 Captura das imagens e quantificação do sinal.....	52
3.7 Pré-análise das lâminas hibridizadas.....	53
3.8 Análise matemática e estatística.....	55
4 RESULTADOS.....	58
4.1 Caracterização das amostras selecionadas.....	58
4.2 RNA Total e RNA amplificado.....	61
4.3 Marcação e Hibridização	66
4.4 Qualidade das lâminas	67
4.5 Identificação de Genes Diferencialmente Expressos entre os quatro grupos do estudo para as amostras de hipocampo e córtex frontal	70
4.6 Aspectos Funcionais dos Genes Diferencialmente Expressos	79
4.7 Genes relacionados à Neuropatologia da DA.....	81
4.8 Genes relacionados à clínica da DA	83
4.9 Classificadores.....	84
5 DISCUSSÃO.....	87
5.1 Qualidade das amostras selecionadas	87
5.2 Contribuição do nosso estudo para o entendimento da DA.....	90
6 CONCLUSÕES.....	99
7 ANEXOS.....	100
8 REFERÊNCIAS	114

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação da qualidade de RNA total avaliado através do aparelho <i>Bioanalyser</i>	41
Figura 2 - Esquema representando o desenho experimental de inversão de corantes (<i>dye swap</i>)	48
Figura 3 - Perfil do RNA total analisado no <i>Bioanalyser</i>	61
Figura 4 - Perfil do RNA amplificado analisado em <i>Bioanalyser</i>	62
Figura 5 - Eletroferograma mostrando a distribuição do tamanho dos fragmentos gerados pela amplificação do RNA mensageiro	63
Figura 6 - Representação da lâmina 4.8K hibridizada com amostra marcada com Cy3, referência com Cy5 e imagem sobreposta	66
Figura 7 - Análise da qualidade das lâminas hibridizadas	67
Figura 8 - Representação da dispersão da quantidade de spots aproveitados para análise	68
Figura 9 - Representação da dispersão da Correlação de <i>Pearson</i> entre as lâminas controle e lâminas <i>swap</i>	69
Figura 10 - Gráfico MMPlot mostrando a qualidade de correlação entre a lâmina controle e a lâmina <i>swap</i> avaliada através de correlação de <i>Pearson</i>	70
Figura 11 - Número de genes diferencialmente expressos obtidos pelo teste de Tuckey ($p < 0,05$)	71
Figura 12 - Esquema representativo mostrando a distância entre os grupos dAD, pAD, OD e N	72
Figura 13 - Clusterização hierárquica dos valores de expressão dos genes obtidos pela ANOVA (303 genes) de todas as amostras	73
Figura 14 - Clusterização hierárquica dos valores de expressão dos genes obtidos pelo SAM (33 genes) de todas as amostras	74

Figura 15 - Clusterização hierárquica dos valores de expressão dos genes obtidos pela ANOVA (163 genes) das amostras de córtex frontal	76
Figura 16 - Clusterização hierárquica dos valores de expressão dos genes obtidos pela ANOVA (177 genes) das amostras de hipocampo	78
Figura 17 - Diagrama de Venn mostrando a seleção de genes potencialmente envolvidos na neuropatologia da DA.	81
Figura 18 - Box-plots dos genes relacionados à neuropatologia da DA, mostrando a associação desses com os estágios de Braak.....	82
Figura 19 - Box-plots dos genes relacionados à neuropatologia da DA, mostrando a associação desses com os escores do CERAD.	82
Figura 20 - Diagrama de Venn mostrando a seleção de genes potencialmente envolvidos com a clínica da DA	83
Figura 21 - Box-plots dos genes relacionados à clínica da DA.....	84
Figura 22 - Discriminador multivariado (três genes) para classificação dos grupos dAD e N.....	85
Figura 23 - Discriminador multivariado (três genes) para classificação dos grupos pAD e N.....	86
Figura 24 - Discriminador multivariado (três genes) para classificação dos grupos dAD e pAD.	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Linhagens celulares selecionadas para compor a referência	47
Tabela 2 - Características específicas de cada fluoróforo utilizado	53
Tabela 3 – Características das amostras selecionadas para o grupo dAD	58
Tabela 4 - Características das amostras selecionadas para o grupo pAD	59
Tabela 5 - Características das amostras selecionadas para o grupo OD	59
Tabela 6 - Características das amostras selecionadas para o grupo N	60
Tabela 7 - Dados referentes ao RNA total e RNA amplificado	64
Tabela 8 - Categorias de processos biológicos hiper-representados ($p < 0,05$) pelos genes diferencialmente expressos obtidos pelo teste de Tuckey	80

LISTA DE SIGLAS

ACA	Angiopatia cerebral amilóide
AES	Aminoterminal enhancer of split
APC	Anaphase promoter complex
ApoE	Apolipoproteína E
aRNA	RNA anti-sense
ARPC3	Actin related protein 2/3 complex, subunit 3
A β	peptídeo β -amilóide
BACE	β -site of APP cleaving enzyme
BEHGEEC	Banco de encéfalos humanos do grupo de estudos sobre envelhecimento cerebral
BSA	Bovine serum albumin
cDNA	DNA complementar
CDR	Clinical Dementia Ratio
CERAD	Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease
CNIH	Cornichon homolog-Drosophila
DA	Doença de Alzheimer
dAD	Doença de Alzheimer definitiva
DEPC	Dietilpirocarbonato
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ENF	Emaranhado neurofibrilar
ERMP1	Endoplasmic reticulum metalloproteinase 1
FDR	False discovery ratio
GDE	Gene diferencialmente exposto
GO	Gene ontology consortium annotation
GTF2H1	General transcription factor IIH, polypeptide 1
H2AFZ	H2A histone family, member Z
HAT1	Histone acetyltransferase 1
KIF16B	Kinesin family member 16B
KIRREL3	Kin of IRRE like 3-Drosophila

LOWESS	Locally weighted scatter-plot smoothing
MHC-II	Major histocompatibility complex, class II
MINPP1	Multiple inositol polyphosphate histidine phosphatase, 1
MYC	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog-avian
N	Indivíduos normais
NIA-RI	National Institute of Aging – Reagan Institute
OD	Outras demências
ORESTES	Open reading frame expressed sequence tags
pAD	Doença de Alzheimer patológica
PKC	Proteína quinase C
PMT	Photomultiplier tube
PN	Placa neurítica
PS	Placa senil
PSEN1	Presenilina 1
PSEN2	Presenilina 2
RAB11A	RAB11A, member RAS oncogene family
RAE1	RAE1 RNA export 1 homolog <i>S. pombe</i>
RIN	RNA Integrity Number
RNA _m	RNA mensageiro
SAM	Significance analysis of microarray
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SRP9	Signal recognition particle 9
SULF1	Sulfatase 1
SVOC	Serviço de verificação de óbitos da capital
SYAP1	Synapse associated protein 1
TA	Temperatura ambiente
TAE	Tris-Acetato-EDTA
UBE2L3	Ubiquitin-conjugating enzyme E2L 3
YRDC	YrdC domain containing <i>E. Coli</i>
ZXDC	ZXD family zinc finger C

Resumo

Silva, ART. *Avaliação da expressão gênica na doença de Alzheimer através da técnica de cDNA microarray em amostras de cérebro postmortem humano* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 123p

A doença de Alzheimer (DA) recebeu intenso estudo durante as décadas passadas. Apesar de ter acontecido avanços significantes no esclarecimento da fisiopatologia da DA, o diagnóstico da doença é ainda imperfeito. Por um lado, cerca de 20% dos pacientes diagnosticados com DA provável, na autópsia, não apresenta alterações patológicas da doença. Por outro lado, por que alguns indivíduos têm alto grau da patologia da DA, mas não tem demência, é uma questão aberta. Para se obter uma melhor compreensão dos achados patológicos e os sinais clínicos na DA, foi buscado um transcriptoma diferencial, através da técnica de cDNA microarray, no hipocampo e córtex frontal de 32 indivíduos divididos em quatro grupos: 1) indivíduos com DA tanto anatomopatológica quanto clínica (DA definitiva); 2) indivíduos clinicamente normais, mas com patologia da DA (DA patológica); 3) indivíduos com comprometimento cognitivo, mas sem a patologia da DA (outras demências); e 4) indivíduos clinicamente normais e sem patologia da DA (normais). Baseado no perfil de expressão gênica desses indivíduos, pôde-se verificar alta similaridade entre DA definitiva e DA patológica. Apesar desta similaridade, classificadores capazes de discriminar essas duas condições foram fornecidos, sugerindo que uma importante diferença entre esses grupos pode estar na progressão do ciclo celular.

Descritores: 1.Doença de Alzheimer 2.Expressão gênica 3.Envelhecimento 4. Cérebro/patologia 5. Demência

Summary

Silva, ART. *Evaluation of the gene expression in Alzheimer's disease by cDNA microarray approach from human postmortem brain samples* [dissertation]. São Paulo: Faculty of Medicine, University of São Paulo; 2008. 123p

Alzheimer's disease (AD) has received intense study during the past decades. The pathophysiology of AD has been clarified but the diagnosis of AD is still imperfect. On one hand, about 20% of patients diagnosed with probable AD are found, at autopsy, to not meet the pathological definition of the disease. On the other hand, why some subjects have high AD neuropathology but do not have dementia is an open question. To achieve a better comprehension of the pathological findings and clinical signs in AD, differential transcriptome was searched, by the cDNA microarray technique, in hippocampus and frontal cortex from 32 individuals separated in four groups: 1) subjects with neuropathology and clinical AD (*definitive* AD); 2) subjects with pathological findings of AD but without any clinical symptom (*pathologic* AD); 3) individuals with cognitive impairment, but without AD pathology (others dementias); and 4) clinically normal individuals, without AD pathology (normal individuals). Based on gene expression profile these individuals, it could verify high similarity between *definitive* AD and *pathologic* AD. Despite this similarity, classifiers which could discriminate AD subjects from clinically normal subjects with AD neuropathology were provided, suggesting that an important difference between those groups could be in cell cycle progression.

Descriptors: 1.Alzheimer disease 2.Gene expression 3. Aging 4.Cerebrum 5.Dementia

1 INTRODUÇÃO

Cem anos após o primeiro relato da doença de Alzheimer (DA), ainda não se compreende completamente os mecanismos etiopatogênicos desta devastadora doença neurodegenerativa. Além disto, não está disponível nenhum método terapêutico capaz de curar a DA ou impedir sua progressão.

1.1 Histórico dos critérios neuropatológicos para o diagnóstico da DA

Ao longo das últimas décadas, vários estudos foram realizados com o objetivo de definir critérios clínicos e neuropatológicos na DA. Mesmo havendo critérios clínicos para o diagnóstico da DA (McKhann et al., 1984; World Health Organization, 1993; American Psychiatric Association, 1994), estes não atingem níveis satisfatórios quanto a sua sensibilidade, especialmente para os estágios iniciais da doença, não conseguindo diagnosticá-la até que a doença tenha levado a um dano cerebral irreversível, sendo necessária a confirmação neuropatológica para o diagnóstico definitivo da doença de Alzheimer. Problemas comuns no diagnóstico inicial incluem a tentativa de decidir se o comprometimento cognitivo dos pacientes é devido à demência ou outros transtornos psiquiátricos, que levam ao declínio cognitivo, como a depressão, e se o paciente tem DA ou outras formas de demências degenerativas que apresentam sintomas clínicos similares. Em função da heterogeneidade

fenotípica da doença, não há marcadores neuropatológicos específicos e, existe sobreposição da DA com alterações encontradas no encéfalo de idosos sem a doença. Não há consenso sobre quais as alterações mais relevantes para o diagnóstico e estadiamento.

Em 1984, foi formado um consórcio de especialistas, que resultou nos critérios de Kachaturian, baseados na quantificação de emaranhados neurofibrilares (ENFs) e placas senis (PSs) (Khatchaturian, 1985). Trabalhos realizados usando esta orientação encontraram uma correlação clínico-patológica boa nos casos mais avançados, porém discordante nos casos iniciais (Markesbery, 1997; Berg et al., 1998).

Já em 1991, Braak et al. publicaram critérios baseados na distribuição dos ENFs e, agruparam as alterações em 6 estágios, mas eles não compararam neuropatologia com sintomas clínicos. Entretanto, eles especularam que os estágios entorrinais (I/II) representam fases clinicamente silenciosas da doença, os estágios límbicos (III/IV) correspondem a DA clinicamente incipiente, e os estágios neocorticais (V/VI) representam a DA completamente desenvolvida.

O *Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease* (CERAD), um estudo longitudinal multicêntrico, foi formado em 1986 com o objetivo de padronizar instrumentos para avaliar pacientes clinicamente com DA. Em 1991, publicaram um protocolo neuropatológico baseado na semiquantificação de placas neuríticas (Mirra et al., 1991). Desde então, essas indicações já foram atualizadas com o intuito de valorizar prováveis

interações com outras causas de demência, como Demência com Corpúsculos de Lewy e Demência Vascular.

Os critérios de Braak e do CERAD mostraram-se mais eficientes na detecção de estágios iniciais que os critérios anteriores. Alguns estudos sugerem que as alterações neurofibrilares são mais relevantes na patogenia da doença, valorizando os critérios de Braak (Arriagada et al., 1992; Bierer et al., 1995). Já outros, encontraram mais evidências a favor das placas senis. Um terceiro grupo defende que ambas as alterações fazem parte do envelhecimento e, que a patogenia da DA decorre de outras lesões (Haroutunian et al., 1998; Price e Morris, 1999). A realidade é que, por mais padronizado que os critérios sejam, os diferentes laboratórios obtêm resultados diferentes em relação ao preparo do material, coloração e mensuração para a mesma amostra.

Mais recentemente, em 1997, o *National Institute of Aging* e o *Ronald and Nancy Reagan Research Institute of Alzheimer's Disease* (NIA-RI) se uniram e publicaram um novo documento que procurou revisar os critérios anteriores, a partir da idéia que a DA é uma entidade clínico-patológica heterogênea e várias comorbidades podem alterar suas manifestações clínicas (The National Institute on Aging and Reagan Institute Working Group, 1997). Houve a preocupação de abranger as indicações anteriores, visto que a patogenia da doença não está bem estabelecida. Neuropatologistas especialistas no estudo das demências foram convidados a opinar sobre seus critérios e de colegas. Mirra, colaboradora do CERAD reconheceu que os ENF podem ser importantes no diagnóstico, mas

salientou que ainda é cedo para fazer uma mudança radical de critérios e que são necessários mais estudos (Mirra, 1997). Outros autores compararam os diversos critérios (Geddes et al., em 1997; Jellinger e Baner, 1997; Schmitt et al., 2000) encontraram alterações neuropatológicas comuns a indivíduos dementados e não dementados. Não houve consenso sobre quais as alterações características dos estágios iniciais da doença. Em conclusão, segundo esse protocolo, os exames de rotina devem ser feitos utilizando métodos semiquantitativos, como os critérios do CERAD, além da pesquisa de ENF no hipocampo e neocórtex. Já em casos de pesquisa, o melhor seria utilizar métodos topográficos, como a classificação de Braak com métodos imuno-histoquímicos.

Apesar dos esforços, o diagnóstico da DA é, ainda, imperfeito. Por um lado, cerca de 20% dos pacientes diagnosticados com DA provável, na autópsia, não se encontra as alterações patológicas da doença. Por outro lado, uma dificuldade no diagnóstico da doença é a existência de sujeitos clinicamente normais que podem exibir considerável neuropatologia da DA, o que causa dificuldade para os critérios diagnósticos em distinguir sujeitos com envelhecimento normal, comprometimento cognitivo leve ou DA incipiente. Estes indivíduos que apenas apresentam a neuropatologia da doença têm sido considerados representantes de uma DA pré-clínica. A validade do conceito de um estágio pré-clínico na DA é sustentada por estudos clínico-patológicos que relatam a presença de lesões características da DA em indivíduos cognitivamente normais (Hulette et al., 1998; Price e Morris, 1999; Schmitt et al., 2000; Mitchell et al., 2002) e por estudos clínicos

longitudinais de alterações leves de memória seguidas por um declínio acelerado (Jacobs et al., 1995; Elias et al., 2000; Small et al., 2000; Godbolt et al., 2005). A capacidade de pacientes com DA pré-clínica lidar melhor com danos cerebrais tem sido, recentemente, explicada pela hipótese de reserva cognitiva (Stern, 2006). Entretanto, um impasse com o conceito da DA pré-clínica é que esse conceito é uma suposição de que se estes indivíduos tivessem sobrevivido tempo suficiente, teriam desenvolvido os sintomas clínicos da DA. Apesar disso, não se pode excluir a possibilidade de que alguns indivíduos podem tolerar lesões neuropatológicas substanciais, mas nunca tornarem-se dementados.

1.2 Características anatomopatológicas da DA

A doença de Alzheimer é uma desordem neurodegenerativa progressiva associada com a idade, caracterizada por mudanças neuropatológicas descritas a seguir:

1.2.1 Aspectos macroscópicos

a) graus variados de atrofia, relacionados ao tempo de duração da doença (Mouton et al., 1994) principalmente nas regiões frontal, temporais, parietais, giro parahipocampal e centro semioval.

b) Hidrocefalia ex-vácuo.

1.2.2 Aspectos microscópicos

Não há consenso sobre qual dos principais marcadores são mais relevantes, os ENFs ou as placas senis neuríticas (PNs) (Berg et al., 1998). Schmitt et al. (2000), em um estudo com 59 cérebros de idosos normais, encontraram apenas 14% dos casos sem emaranhados neurofibrilares, enquanto Haroutunian et al. (1998), sugerem que essa alteração sempre acompanha o envelhecimento cerebral. Quanto à PS, a maioria dos autores concorda que as do tipo difuso podem ser encontradas no envelhecimento normal enquanto as neuríticas são mais associadas à doença de Alzheimer.

a) Emaranhados neurofibrilares

Um achado muito freqüente, mas não específico da DA, é a presença de emaranhados neurofibrilares. Grande parte dos ENFs é formada pela proteína tau hiperfosforilada. Tau é uma proteína associada a microtúbulos, cuja principal função é promover o agrupamento de microtúbulos e manter sua estabilidade. Tau pode ser fosforilada em vários sítios de serina e treonina, com numerosas quinases incluindo cyclin-dependent kinase 5 (CDK5), glycogen syntase kinase 3 (GSK3), mitogen-activated protein kinase (MAPK), protein kinase C (PKC) e Akt podendo fosforilá-la (Zhang et al., 2006). Sabe-se que a tau hiperfosforilada não é capaz de manter a estabilidade dos microtúbulos levando a alterações da citoarquitetura neuronal e acúmulo de proteínas anormais do citoesqueleto (Iqbal et al.,

2005). Estas alterações levam a perda de sinapses, diminuição do transporte axonal e plasticidade sináptica (Li et al., 2007).

Os ENFs são considerados por diversos autores como os grandes marcadores da DA e com boa correlação clínico-patológica (Arriagada et al., 1992; Braak e Baak, 1991).

b) Placas senis

Também consideradas boas marcadoras da DA (Price & Morris, 1999; Selkoe, 2000). São reconhecidas duas formas principais:

- Difusa: praticamente amorfas. Associadas ao envelhecimento normal.

- Neurítica: com neuritos (axônios e dendritos) distróficos.

Há dúvidas quanto sua relação com a gravidade e cronicidade da enfermidade. Harotunian et al. (1998), em estudo com 64 cérebros de idosos sem demência ou com formas leves, sugeriram que a concentração de placas senis neuríticas no neocórtex se associa com a gravidade do quadro clínico. Estes mesmos autores demonstraram placas senis neuríticas, classicamente associadas à DA, em 28% dos indivíduos não dementados, indicando que a lesão associada à demência pode ser outra.

A região central das placas neuríticas é composta de conteúdo protéico. O peptídeo dominante é denominado beta amilóide, derivado de uma proteína maior denominada precursora do amilóide (APP, do inglês, *amyloid precursor protein*). Acredita-se que o peptídeo beta-amilóide (A β)

está intimamente relacionado ao desenvolvimento fenotípico que leva à demência, à redução na transmissão sináptica e à degeneração associadas à doença (Selkoe, 2002).

Polímeros do peptídeo beta-amilóide adquirem conformação fibrilar e são responsáveis por disfunção e morte neuronal em culturas de células e tecidos animais (Lorenzo e Yankner, 1994). Evidências recentes indicam que oligômeros solúveis do peptídeo beta-amilóide interferem com a transmissão sináptica e podem ser os principais responsáveis pela cascata de eventos patogênicos (Walsh et al., 2002).

c) Neurophil Treads

Compostos por proteína Tau. Ainda de significado incerto, podem contribuir para desorganização das conexões nervosas (McKee et al., 1991). Também encontrados em outras afecções.

d) Angiopatia cerebral amilóide (ACA)

Caracterizada por depósito de substância amilóide nas paredes de artérias e arteríolas do espaço subaracnóideo e córtex. Também, presentes em indivíduos sem demência, relacionada a um distúrbio genético (Rovelet-Lecrux et al., 2006).

e) Corpúsculos de Hirano

De significado incerto. Presentes em indivíduos normais (Gibson & Tomlinson, 1977; Santa-Mara et al., 2008)

f) Degeneração granulovacuolar

Aparece no citoplasma de neurônios em DA e em indivíduos normais, em especial na área CA1 do hipocampo (Xu et al., 1992).

g) Lesões associadas

Ainda não é conhecido o mecanismo de como elas agravam a DA, mas há estudos que indicam piora clínica em casos de Demência Vascular e Demência com Corpúsculos de Lewy (Del Ser et al., 2005).

h) Alterações celulares próprias da doença

Acredita-se que o número de neurônios presentes no encéfalo seja reduzido através de processos patológicos degenerativos. Ocorre importante redução do número de neurônios na DA, principalmente na formação hipocampal (córtex entorrinal e CA1) (Gómez-Isla, 1996, West et al., 2004).

Além disso, certas populações subcorticais de neurônios sofrem significativa degeneração (Lyness et al., 2003).

i) Alterações sinápticas

A extensão da perda sináptica correlaciona-se bastante bem com a intensidade da demência (Terry *et al.*, 1991; Samuel *et al.*, 1994). Recentemente, vários estudos vêm sendo realizados, determinando o papel desempenhado por alterações sinápticas na fisiopatologia da demência (Shankar et al., 2008; Pomponi et al., 2008).

j) Alterações do ciclo celular

Mais recentemente, alterações do ciclo celular têm sido mostradas. Proteínas relacionadas ao ciclo celular são expressas em uma população de neurônios mais susceptível à DA, mas não são expressas em controles ou em regiões do próprio cérebro com DA onde a degeneração não é prevalente (Herrup e Arendt, 2002). Estas alterações de ciclo celular são encontradas antes da deposição de placas β -amilóide em um padrão que recapitula a vulnerabilidade neuronal seletiva observada na DA e, fortemente, implica a iniciação do ciclo celular como um fator causativo na morte desses neurônios (Yang et al., 2006). Qual é a causa dessa reentrada na ciclo celular não é bem descrito. Evidências sugerem que a iniciação ectópica do processo de ciclo celular em neurônios é um sinal inicial de

estresse (Mcshea et al., 2007). É bem conhecido que na DA, a iniciação do ciclo celular, incluindo a replicação do DNA, pode ser seguida por vários meses, durante os quais neurônios aneuplóides persistem em um estado funcional (Herrup e Yang, 2007). O longo tempo requerido entre a iniciação do ciclo celular e a morte na DA sugere que, *in vivo*, existem outros fatores que podem ser responsáveis pelo processo de morte. Tem sido sugerido que o estresse oxidativo e o subsequente acúmulo de p53 exercem um papel importante na parada do ciclo celular (Sugano et al., 1995). Assim, a parada do ciclo celular poderia, potencialmente, expor a célula a um elevado insulto oxidativo crônico, o qual o neurônio não é capaz de neutralizar (Webber et al., 2005; Yang e Herrup, 2007).

Estas informações são de grande interesse e sugerem que características neuropatológicas específicas podem influenciar a DA em estágios específicos da doença. Entretanto, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares que ocultam a progressão clínica da DA.

1.3 Biologia Molecular

Com os avanços da biologia molecular iniciou-se uma fase de busca por alterações no DNA que pudessem explicar doenças complexas. Algumas formas da DA podem ser herdadas. A elevada incidência de pacientes portadores de Síndrome de Down que desenvolvem a doença de Alzheimer determinou atenção especial para o estudo do cromossomo 21. A descoberta do gene codificador da APP, envolvida na formação da placa senil, que se localizava neste cromossomo, corroborou a idéia de que uma alteração no cromossomo 21 poderia ser determinante para a fisiopatologia da DA (Goate et al., 1991). Mutações em pacientes com início precoce da doença e história familiar foram encontradas, também, nos cromossomos 14 (Sherrington et al., 1995) e 1 (Levy-Lahad et al., 1995) onde se localizam os genes da presenilina 1 (PSEN1) e presenilina 2 (PSEN2), respectivamente.

A proteína APP é uma glicoproteína transmembrana de expressão ubíqua. A APP é clivada por pelo menos três enzimas: α -, β - e γ -secretases. O local da clivagem pela α -secretase envolve atividade da proteína quinase C (PKC) que é ativada através de receptores celulares de acetilcolina. O aumento da atividade da α -secretase ocasiona aumento do metabolismo secretor da APP sem formação do peptídeo β -amilóide ($A\beta$). Assim, o aumento da disponibilidade de acetilcolina a nível sináptico altera favoravelmente o metabolismo ocasionando redução na formação do peptídeo $A\beta$, enquanto que disfunções colinérgicas corticais aumentam a produção do mesmo (Schliebs, 2005). Por outro lado, a clivagem através da

enzima β -secretase (BACE, do inglês, *β -site of APP cleaving enzyme*) origina fragmentos que contêm o peptídeo A β . Hoje, já está claramente demonstrada a correlação do aumento da expressão de BACE com o aumento da produção de placas (Li et al., 2004). Posteriormente, os fragmentos gerados pela β -clivagem sofrem a ação da γ -secretase resultando na formação do peptídeo A β . Portanto, os peptídeos A β são originados pela clivagem proteolítica de duas proteases, β - e γ -secretase (Iwatsubo et al., 1994; Vassar et al., 1999). As placas senis são constituídas principalmente dos peptídeos A β de 40 (A β 40) e 42 (A β 42) resíduos de aminoácidos. Sob condições fisiológicas, a razão de A β 42 sobre A β 40 é cerca de 1:10. A β 42 exerce um papel crítico na patogênese da DA já que sua capacidade agregativa e neurotoxicidade são muito maiores que aquelas da A β 40 (Iwatsubo et al., 1994).

Presenilinas são subunidades catalíticas da γ -secretase (Takasugi et al., 2003). A maioria das mutações da presenilina aumenta a produção de A β 40-42. Já as mutações da APP estão localizadas adjacentes aos sítios de clivagem da β - e γ -secretase ou dentro do próprio domínio do peptídeo A β . Mutações próximas ao sítio de clivagem da β -secretase aumentam a quantidade total dos peptídeos A β , enquanto que aquelas próximas ao sítio de clivagem da γ -secretase aumentam a produção do peptídeo A β 42.

Atualmente, já foram identificadas mais de 200 mutações patogênicas nos genes associados às formas familiares de DA (168 para PSEN1; 29 para APP e 10 para PSEN2) (*Alzheimer Disease Mutation Database* - <http://www.molgen.ua.ac.be/ADMutations/default.cfm>). Esse grande número

de mutações patogênicas já identificadas em pacientes com DA, as quais têm sido associadas com uma alteração no processamento metabólico da APP/peptídeo A β , não explica todos os casos da DA. Juntas, essas mutações são responsáveis por 30 a 50% dos casos de DA herdados de forma autossômica dominante, e cerca de 0,5% da DA no geral. Embora mutações em genes conhecidos seja uma causa rara da DA, eles são importantes para o diagnóstico pré-sintomático de pacientes de famílias com DA autossômica dominante que segregam essas mutações. Ademais, a identificação desses genes e mutações tem sido extremamente importante para o recente progresso no entendimento da biologia da DA. O fato das manifestações clínicas e neuropatológicas da DA familiar e esporádica serem indistinguíveis, exceto pela idade de surgimento e histórico familiar, possibilita que estudos das formas familiares sejam uma boa fonte para se identificar marcadores diagnósticos da DA (Selkoe & Podlisny, 2002).

Até hoje não se encontrou nenhuma mutação no gene codificador da tau associada com Alzheimer, no entanto, varias alterações no gene estão associadas com a Demência Frontotemporal (Hutton et al., 1998). Porém, o envolvimento direto da tau na DA está bastante sustentado por estudos de modelos animais para DA que carregam cópias a mais ou a menos para o gene humano da tau (Roberson et al., 2007). Por estes trabalhos, tem-se estabelecido que as alterações da tau na DA sejam secundárias a formação do peptídeo A β , porém são fundamentais para as alterações cognitivas observadas na doença.

A descoberta do polimorfismo do gene que codifica a Apolipoproteína E (ApoE) marcou o início da busca por marcadores gênicos de suscetibilidade para a DA. A ApoE é uma proteína polimórfica com três isoformas comuns – apo e2, apo e3 e apo e4 – e codificadas por três alelos – $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$ – no cromossomo 19. A presença do alelo $\epsilon 4$ aumenta o risco de doença e reduz a idade de surgimento dos sintomas (Saunders et al., 1993). Em contraste, a presença de $\epsilon 2$ tem efeito protetor para DA (Corder et al., 1994). Esta constatação é válida para diferentes raças e foi replicada em diversos centros ao redor do mundo. No entanto, estas mutações representam um percentual muito pequeno dos casos de DA, sendo a grande maioria, casos esporádicos, que continuam descobertos pelo diagnóstico clínico ou só podem ser confirmados após a morte.

1.3.1 Estudos de expressão gênica em larga escala utilizando cDNA Microarray

Recentes avanços tecnológicos incluindo métodos de análise em grande escala, como os microarranjos de cDNA (cDNA microarrays), permitem uma avaliação do padrão de expressão de milhares de genes em muitas amostras, possibilitando a identificação de perfis de expressão gênica típicos de determinadas doenças em um período de tempo relativamente pequeno (Shoemaker e Linsley, 2002).

Alterações nos padrões de expressão de múltiplos genes podem oferecer novos dados a respeito de mecanismos regulatórios e vias

bioquímicas. Novos genes e vias que nunca foram inter-relacionados a processos fisiopatológicos e doenças neurodegenerativas podem emergir de estudos de genética molecular. Portanto, a análise da expressão gênica é de profunda importância para o melhor entendimento dessas desordens.

O método consiste na hibridização de milhares de genes imobilizados em uma lâmina de vidro ou membrana de nylon, por amostras fluorescentes ou radioativas de cDNA, preparadas a partir de RNA de células, tecidos ou outras fontes biológicas. Essa metodologia requer entre 30 a 200µg de RNA total ou 2 a 7µg de poli(A) RNA (RNAm) para a hibridização necessitando da utilização de metodologias que permitam a amplificação do RNAm das amostras (Wang, *et al*, 2000, Puskás *et al*, 2002, Gomes *et al*, 2003). Dessa forma, com a utilização das metodologias de amplificação de RNA é possível fazer experimentos de *microarray* com amostras de cérebro *postmortem*.

Na tentativa de identificar genes candidatos cuja expressão esteja alterada, vários estudos de *microarray*, utilizando tecido cerebral *postmortem* de humanos, já foram publicados (Ginsberg *et al.*, 2000; Loring *et al.*, 2001; Pasinetti *et al.*, 2001; Colangelo *et al.*, 2002; Yao *et al.*, 2003; Blalock *et al.*, 2004; Emilsson *et al.*, 2006; Brooks *et al.*, 2007; Katsel *et al.*, 2007; Counts *et al.*, 2007), propondo uma gama de vias moleculares que podem estar afetadas na DA, destacando a complexidade da doença. No entanto, muitos desses trabalhos avaliaram somente uma região cerebral de indivíduos com DA comparados a indivíduos normais (Ginsberg *et al.*, 2000; Loring *et al.*, 2001; Pasinetti *et al.*, 2001; Colangelo *et al.*, 2002; Yao *et al.*, 2003; Emilsson *et al.*, 2006; Brooks *et al.*, 2007) e poucos estudos têm olhado para

os estágios iniciais da DA (Blalock et al., 2004; Katsel et al., 2007; Counts et al., 2007), não levando em consideração sujeitos clinicamente normais, mas que possuem a neuropatologia da DA.

Portanto, por ser fundamental entendermos o que separa a DA do envelhecimento normal, esse trabalho busca por um transcriptoma diferencial em indivíduos classificados de acordo com seus achados neuropatológicos e sinais clínicos, sendo a execução deste trabalho muito importante e justificada por apresentar as seguintes diferenças dos trabalhos apresentados até o momento:

- a) Análise de duas áreas cerebrais diferentes provindas do mesmo indivíduo;
- b) Avaliação cognitiva relacionada com o exame neuropatológico, avaliando não só indivíduos com DA comparados a indivíduos normais, mas também indivíduos que, apesar de serem clinicamente normais, apresentam características neuropatológicas da DA, e, também, indivíduos com comprometimento cognitivo que não apresentam a patologia da DA.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Avaliar o perfil de expressão gênica, através da técnica de *cDNA microarray*, no hipocampo e córtex frontal dos seguintes grupos:

- 1) Indivíduos com DA no exame anatomopatológico e com comprometimento cognitivo (Alzheimer definitivo - dAD).
- 2) Indivíduos com DA no exame anatomopatológico e sem comprometimento cognitivo (Alzheimer patológico - pAD).
- 3) Indivíduos sem neuropatologia da DA e com comprometimento cognitivo (outras demências – OD).
- 4) Indivíduos sem neuropatologia de DA e sem comprometimento cognitivo (normais – N).

2.2 Objetivos específicos

- Baseado no perfil de expressão gênica, buscar genes ou vias diferencialmente expressos que possam distinguir ou classificar as seguintes condições

- Indivíduos com DA no exame anatomopatológico e com comprometimento cognitivo (dAD) de indivíduos normais (N).
- Indivíduos com DA no exame anatomopatológico e sem comprometimento cognitivo (pAD) de indivíduos normais (N).

- Indivíduos com DA no exame anatomopatológico e com comprometimento cognitivo (dAD) de indivíduos com DA no exame anatomopatológico e sem comprometimento cognitivo (pAD).

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Amostras

3.1.1 Escalas utilizadas para avaliação neuropatológica e cognitiva

3.1.1.1 Avaliação Neuropatológica

A classificação de Braak (Braak & Braak, 1991), utilizada para o exame anatomopatológico, é baseada na distribuição dos ENFs e agrupa as alterações em 6 estágios: estágios entorrinais (I / II), estágios límbicos (III / IV) e estágios neocorticais (V / VI).

O CERAD (Mirra et al., 1991) utiliza a semiquantificação de placas neuríticas (PN), onde são considerados 4 níveis: 0: nenhuma placa, A: esparsas, B: moderadas, C: freqüentes.

3.1.1.2 Avaliação Clínica

Escore Clínico de Demência (CDR, *Clinical Dementia Ratio*) – (Morris et al., 1993; Burke et al., 1988) – esta escala têm se tornado “gold standard” para a avaliação global de pacientes portadores de demência tipo Alzheimer, mas também está indicada para a avaliação de outros tipos de demência. Avalia seis domínios: memória, orientação, julgamento e resolução de

problemas, assuntos comunitários, casa e hobbies, autocuidado. Desse modo, a escala cobre a intersecção entre a funcionalidade e os aspectos cognitivos. Estadia cinco níveis: CDR 0 – status cognitivo normal; CDR 0,5 – questionável, também considerado como comprometimento cognitivo leve; CDR 1 – demência leve; CDR 2 – demência moderada; CDR 3 – demência avançada.

3.1.2 Amostras Seleccionadas

Foram avaliados 64 fragmentos de cérebro, referentes a 32 indivíduos, considerando que para cada indivíduo foram amostradas 2 regiões cerebrais – hipocampo (H) e córtex frontal (F).

As amostras foram agrupadas da seguinte maneira:

- Alzheimer definitivo (dAD) - 9 indivíduos com DA no exame anatomopatológico (Braak = IV / V / VI e CERAD $\neq$ 0) e com comprometimento cognitivo (CDR $\geq$ 1): 9 fragmentos de córtex frontal e 9 fragmentos de hipocampo.
- Alzheimer patológico (pAD) - 5 indivíduos com DA no exame anatomopatológico (Braak = IV / V / VI e CERAD $\neq$ 0) e sem comprometimento cognitivo (CDR=0): 5 fragmentos de córtex frontal e 5 fragmentos de hipocampo.
- Outras Demências (OD) - 9 indivíduos sem DA no exame anatomopatológico (Braak = 0 / I / II e CERAD $\neq$ C) e com comprometimento

cognitivo ($CDR \geq 1$): 9 fragmentos de córtex frontal e 9 fragmentos de hipocampo.

➤ Normais (N) - 9 indivíduos sem DA no exame anatomopatológico e (Braak = 0/ I / II e CERAD $\neq$ C) e sem comprometimento cognitivo ($CDR = 0$): 10 fragmentos de córtex frontal e 10 fragmentos de hipocampo).

Todo material foi proveniente do Banco de Encéfalos Humanos do Grupo de Estudos de Envelhecimento Cerebral (BEHGEEC) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da FMUSP como subprojeto do Protocolo de Pesquisa nº 285/04.

3.1.3 Banco de cérebros da FMUSP

O BEHGEEC foi criado em 2004 para atender à demanda por amostras do Projeto Envelhecimento Cerebral. É uma iniciativa do Departamento de Patologia, Disciplina de Geriatria e Departamento de Neurologia da mesma instituição. O material é captado no Serviço de Verificação de Óbitos da Capital (SVOC), localizado no subsolo da FMUSP, sendo processado e armazenado no Laboratório de Fisiopatologia do Envelhecimento coordenado pelo Prof. Dr. Wilson Jacob Filho.

A estrutura disponível no SVOC é única. Não há no mundo instituição que promova quantidade semelhante de exames necroscópicos. No Brasil, a

necropsia é obrigatória sempre que há dúvidas sobre o diagnóstico de óbito. O paciente está dispensado do exame apenas quando apresenta o atestado de óbito preenchido por um médico que acompanhou o paciente e pode estabelecer a causa com exatidão. Em outros países, a prática do exame necroscópico é bem menor, o que torna difícil a captação de órgão para estudo. Nestas nações, a captação de órgãos para estudo é feita a partir da doação voluntária e prévia do paciente ou de familiares. No Barsil, é possível realizar a captação dos órgãos no momento da necropsia, mediante consentimento da família. Esta diferença aumenta sobremaneira a disponibilidade de órgãos para pesquisa científica.

3.1.3.1 Recepção e seleção dos casos

Todos os casos são provenientes do SVOC. Este serviço concentra todas as autópsias de mortes naturais por causa mal definida da cidade de São Paulo. A cada ano são realizadas por volta de 13000 autópsias, 60% delas em pessoas acima de 50 anos de idade. Os critérios de seleção dos casos foram:

Critério de inclusão

- Pessoas com idade acima de 50 anos na data da morte.

Crterios de excluso

- Indivduos que morreram por causas cerebrais primrias: acidente vascular enceflico de origem isqumica ou hemorrgica, traumatismo craniano; meningite, tumores, etc.
- Pacientes que passaram por situaes com o potencial de causar leses cerebrais isqumicas secundrias como, por exemplo, a encefalopatia anxica de longa durao;
- Pacientes portadores de comorbidades que possam, potencialmente, prejudicar a funo cognitiva no perodo de seis meses anteriores ao bito, como aqueles portadores de doenas crnicas em fase avanada, ou depresso, retardo mental e outros transtornos psiquitricos.
- Inexistncia do cuidador primrio ou familiar responsvel para fornecer informaes adequadas relacionadas histria pregressa, antecedentes pessoais e funcionalidade do indivduo.
- Pacientes com uso crnico de benzodiazepnicos (mais que 6 meses).

Na chegada do cadver ao SVOC, caso o sujeito atenda aos crterios de seleo, explicado ao responsvel pelo indivduo (cuidador) sobre a natureza do projeto e apresentado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. No caso de aceite, o cuidador mais indicado identificado para que se possa alcanar confiabilidade das informaes transmitidas. dada preferncia para o cuidador primrio. No caso de indivduos que no tinham

cuidador primário, a escolha do cuidador é feita a partir da identificação do familiar que tenha maior vínculo com o paciente (contato de no mínimo uma vez por semana).

Todo esse procedimento é realizado por uma equipe treinada e coordenada por uma Gerontóloga (Dra. Renata Ferreti). Como os cadáveres só são submetidos à autópsia quando reclamados pelos responsáveis e como se segue uma espera de algumas horas até a liberação do corpo, as entrevistas não atrasam os procedimentos funerários.

3.1.3.2 Coleta e armazenamento

No momento da autópsia, realizada entre 4 a 16 horas após o óbito, o médico responsável separa o encéfalo dos casos selecionados.

Amostras de tecido encefálico foram obtidas de duas regiões cerebrais: hipocampo e córtex frontal. A coleta foi feita usando instrumentos de polietileno e os fragmentos foram colocados em invólucros e estocados em freezer a -80°C até o momento da extração de RNA.

3.2 Extração de RNA total

3.2.1 RNeasy Mini Kit (QIAGEN)

Este kit foi desenvolvido para isolar RNA total de pequenas quantidades de material inicial. É um método simples e rápido que combina

propriedades de ligação seletiva de uma membrana de sílica-gel com a velocidade das micro-centrífugas.

O protocolo utilizado foi o de “Isolação de RNA total para tecidos animais”, fornecido pelo fabricante, com algumas modificações para aumentar a quantidade de RNA total obtido.

Em tubos de homogeneização foi colocada a solução de lise (buffer RLT – fornecido pelo fabricante + β -mercaptoetanol*. A amostra, depois de cortada em pedaços menores utilizando um bisturi, foi colocada no tubo de homogeneização com 600 μ l da solução de lise e homogeneizada em homogeneizador (Poytron[®] - Kinematica). A solução resultante foi transferida para tubo de 1,5 ml e esse centrifugado a 14000 rotações por minuto (rpm) por 3 minutos (min) a temperatura ambiente (TA). O sobrenadante foi passado para um novo tubo de 1,5 ml e adicionou-se 600 μ l de etanol 70% - tratado com H₂O - DEPC (dietilpirocarbonato), misturando o sobrenadante com o etanol por pipetagem. Posteriormente, 700 μ l dessa mistura foi adicionada à coluna (fornecida pelo fabricante), que contém a membrana de sílica-gel, e centrifugada a 13000 rpm durante 50 segundos (s) / TA. O filtrado foi descartado e esse passo repetido até que toda amostra fosse filtrada. A seguir, 700 μ l de tampão de lavagem (buffer RW1 – fornecido pelo fabricante) foi adicionado a coluna com posterior centrifugação a 13000 rpm por 50 s / TA. O filtrado foi descartado e 500 μ l de um outro tampão de lavagem (buffer RPE, que contém etanol, fornecido pelo fabricante) foram adicionados à coluna e centrifugados a 13000 rpm por 50s / TA (esse passo foi repetido 2 vezes). Posteriormente, foram pipetados

500 µl de etanol 80% na coluna com centrifugação a 13000 rpm por 1 min / TA. O filtrado foi descartado e a mesma centrifugação foi realizada para retirar o excesso de álcool. A coluna foi transferida para um novo tubo de 1,5 ml e o RNA total foi eluído por adição de 30 µl de H₂O – DEPC diretamente na membrana e centrifugação a 13000 rpm durante 1 min / TA. O RNA total foi concentrado em centrífuga a vácuo (*CentriVap Concentrator LABCONCO*) e depois ajustado para um volume final de 12 µl, em que 1 µl foi utilizado para quantificação e 1 µl para análise de qualidade.

* Foram adicionados 10 µl de β-mercaptoetanol para cada 1 ml de buffer RLT.

3.2.2 Quantificação do RNA total

A quantificação do RNA extraído foi determinada por espectrofotometria na região do ultravioleta através da leitura da absorbância nos comprimentos de onda de 260 e 280 nanômetros utilizando espectrofotômetro (NanoDrop[®] ND-1000). O grau de pureza do RNA foi avaliado com base na razão entre as leituras de 260 e 280nm, uma vez que valores superiores a 1,8 para essa relação sugerem que o RNA está essencialmente puro e passível de ser usado na maioria dos procedimentos de manipulação genética.

3.2.3 Avaliação da Integridade do RNA total

A qualidade do RNA total das amostras foi analisada através do aparelho Bioanalyser 2100 Agilent (*Agilent Technologies*) que usa detecção de fluorescência, monitorando-a entre 670nm e 700nm. Foi utilizado o RNA 6000 Pico LabChip Kit, no qual a quantidade de amostras a serem avaliadas deve ser extremamente pequena (de 200 pg a 5 ng). O *software* automaticamente calcula a proporção das áreas dos picos das bandas ribossomais 18S e 28S (relação deve ser ≥ 1) para amostras eucarióticas. É construído um eletroferograma e calculado um número de integridade do RNA (RIN-RNA Integrity Number). O RIN varia de 0 a 10 em ordem crescente de integridade. As amostras com índice inferior ao estabelecido como critério de qualidade (RIN>4) ou relação entre as bandas correspondentes aos RNA ribossomais 28S e 18S menor que 1 foram descartadas. O protocolo utilizado foi o fornecido pelo fabricante. Um exemplo da qualidade do RNA total avaliado através do aparelho Agilent 2100 Bioanalyser pode ser visualizado na Figura 1.

Figura 1. Representação da qualidade de RNA total avaliado através do aparelho *Bioanalyser*. A: Imagem do gel obtido pela eletroforese de RNA total mostrando as bandas 18S e 28S; B: Número de integridade do RNA (RIN); C: Eletroferograma mostrando os picos das bandas ribossomais 18S e 28S

3.3 Amplificação de RNA mensageiro

Como a quantidade de RNA total extraído nem sempre é suficiente para os experimentos de *microarray* com seus devidos controles foi necessária a realização da amplificação do RNAm. Essa metodologia permite aumento das quantidades de RNAm na ordem de 10^3 sem prejudicar as proporções das diferentes espécies presentes na amostra analisada.

Esse protocolo é baseado em Wang *et al.* (2000) e Gomes *et al.* (2003), com modificações. Resumidamente, o cDNA foi sintetizado a partir do RNA total, utilizando primers oligo dT(24) (*Integrated DNA Technologies*) que ancoram na cauda poli-A dos RNAm e possuem a 5' de sua seqüência um sítio de reconhecimento da RNA polimerase II. A partir da primeira fita de cDNA foi sintetizada a segunda fita e este cDNA fita dupla foi submetido a uma transcrição *in vitro* para uma produção exponencial de RNA. Esse procedimento foi repetido em dois ciclos produzindo quantidade suficiente para os experimentos seguintes.

Na reação de síntese de primeira fita de cDNA foram utilizados 1,5 µg de RNA total e 1,0 µl de 0,3 µg/µl Oligo dT(24)-T7 primer (5'AAA CGA CGG CCA GTG AAT TGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG CGC T(24)3')[57-mer] em um volume total de 6,7 µl. Esse *primer* carrega o promotor do fago T7 bacteriano, que será utilizado para a transcrição *in vitro*. O RNA total com o *primer* Oligo dT(24)-T7 foi desnaturado a 70°C por 10 minutos e esfriado em gelo e então adicionado 4,0 µl Improm™ II 5X Reaction Buffer (*Promega*), 4,8 µl de MgCl₂ 25 mM (*Promega*), 0,5 µl RNaseIN (*Promega*), 2,0 µl dNTP

10mM (*Pharmacia*) e 1,5 μ l ImProm-IITM Reverse Transcriptase (*Promega*). A síntese do cDNA é completada após 2h a 42°C.

A segunda fita do cDNA foi feita pela adição de 16,2 μ l água DEPC, 10,0 μ l de Second Strand Buffer 5X (*Invitrogen*), 1,0 μ l dNTP 10mM (*Pharmacia*), 0,3 μ l RNase H (*Invitrogen*), 0,5 μ l de *E. coli* DNA ligase 10U/ μ l (*Invitrogen*), 2,0 μ l *E. coli* DNA polimerase I 10U/ μ l (*Invitrogen*). A reação é incubada por duas horas a 16°C, ao fim desse período, foi adicionado 1,0 μ l de T4 DNA polimerase I 50U/ μ l (*Invitrogen*) e novamente incubado a 16°C por 5 minutos. A reação é finalizada pela adição de 10,0 μ l de 0,5M EDTA.

A purificação do cDNA dupla fita foi feita pela adição de 90,0 μ l de água DEPC a reação e posterior mistura com 150,0 μ l de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) pH 8,0. Essa mistura foi centrifugada a 14000 rpm por 5 minutos / TA. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo contendo 150,0 μ l de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e a mistura centrifugada por mais 5 min a 14000 rpm / TA. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo para precipitação do cDNA.

O cDNA foi precipitado pela adição de 2,5X o volume recuperado da fase aquosa (V_r) de etanol 100% (*MERCK*) a -20°C, 0,5X V_r de acetato de amônio 7,5M e 2,0 μ l de acrilamida 200 η g/ μ l (*Ambion, Inc. – Applied Biosystems*), incubação por 30 min a -80°C e centrifugação a 14000 rpm durante 30 min / 4°C. O precipitado foi lavado 3 vezes com etanol 70% e ressuspendido em 10,0 μ l de H₂O-DEPC.

Para a transcrição *in vitro*, foi utilizado o *RiboMAXTM Large Scale RNA Production Systems – T7* - *Promega*. Dez μ l do ds-cDNA (cDNA dupla fita)

foram adicionados a 7,5µl rNTP 25mM, 5,0µl de Reaction Buffer 5X e 2,5µl da solução de misturas de enzimas (RNase IN e fago T7 polimerase) e a reação foi incubada a 37°C por 5h.

A purificação do aRNA (RNA anti-sense) foi feita pelo reagente contendo isotiocianato de guanidina-fenol (TRIzol[®] Reagent - *Invitrogen*) conforme indicações do fabricante. O RNA foi precipitado com isopropanol (volume/volume), acetato de sódio 3M pH 5.2 e 0,5µl de glicogênio 20mg/ml. O aRNA foi ressuspendedido em 6,0µl de água DEPC.

Para o segundo ciclo de amplificação, a primeira fita de cDNA foi sintetizada com 6,0µl de aRNA e 2,0µl de *random primer* (dN6) 3µg/µl (*Invitrogen Life Technologies*, Carlsbad, CA) e incubação a 70°C/10min. Depois, foram acrescentados 4,0 µl de Improm[™] II 5X Reaction Buffer (*Promega*), 4,8 µl de MgCl₂ 25 mM (*Promega*), 0,5 µl RNaseIN (*Promega*), 2,0 µl dNTP 10mM (*Pharmacia*) e 1,0 µl ImProm-II[™] Reverse Trascriptase (*Promega*). A síntese do cDNA foi completada após 2h a 42°C. A segunda fita do cDNA foi feita pela adição de 1,0µl Oligo dT(24)-T7 primer 0,5 µg/µl, 64,3µl água DEPC, 10,0µl de tampão Advantage PCR (*Clontech*) , 2,0µl dNTP 10mM (*Pharmacia*), 0,7µl RNase H (*Invitrogen*) e 2,0µl Advantage Polimerase (*Clontech*) seguindo os seguintes ciclos de incubações: 37°C/10min para digestão do RNA; 94°C/3min para denaturação; 65°C/5min para a ligação dos primers e 75°C/30min para extensão. A parada da reação e a degradação ribossômica foi realizada pela adição de 6,5µl de NaOH 1N/EDTA pH 8,0 por 15 min a 70°C.

A purificação do cDNA dupla fita foi feita pela mistura com 120,0 µl de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) pH 8,0. Essa mistura foi centrifugada a 14000 rpm por 5 minutos / TA. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo contendo 120,0 µl de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e a mistura centrifugada por mais 5 min a 14000 rpm / TA. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo para precipitação do cDNA.

O cDNA foi precipitado pela adição de 2,5X o volume recuperado da fase aquosa (V_r) de etanol 100% (MERCK) a -20°C, 0,5X V_r de acetato de amônio 7,5M e 1,0 µl de acrilamida 5,0 µg/µl (Ambion, Inc. – Applied Biosystems), incubação por 30 min a -80°C e centrifugação a 14000 rpm durante 30 min / 4°C. O precipitado foi lavado 3 vezes com etanol 70% e ressuspendido em 10,0 µl de H₂O-DEPC. A partir desse ponto, repetiu-se exatamente os passos do primeiro ciclo de amplificação, resultando no aRNA segundo *round*.

3.3.1 Avaliação da qualidade e quantidade do RNA amplificado

3.3.1.1 Gel de agarose

A avaliação das amostras de RNA amplificado foi realizada em gel de agarose 1% em uma corrida com duração de 50 minutos na voltagem de 60 mV. Quinhentos ng de RNA amplificado foram adicionados a 5µl de tampão TAE com 7M uréia, 3X *Loading Buffer* azul de bromofenol e 2µl de brometo de etídio 0,5 µg/µl antes de ser aplicada no gel. As amostras devem apresentar um perfil de amplificação onde a maior concentração de RNA

amplificado seja maior que 200 pares de base (pb), critério de qualidade previamente estabelecido por nosso grupo, sendo aquelas que apresentam as lâminas hibridizadas de melhor qualidade.

3.3.1.2 *Bioanalyzer*

A qualidade do RNA amplificado foi analisada através do aparelho Bioanalyser 2100 Agilent que usa detecção de fluorescência, monitorando-a entre 670nm e 700nm. Foi utilizado o RNA 6000 Nano LabChip Kit. É construído um eletroferograma onde as amostras devem apresentar um perfil de amplificação onde a maior concentração de RNA amplificado seja maior que 200 pb.

3.3.1.3 Quantificação do RNA amplificado

A quantificação do RNA amplificado foi determinada por espectrofotometria na região do ultravioleta através da leitura da absorbância nos comprimentos de onda de 260 e 280 nanômetros utilizando espectrofotômetro (NanoDrop[®] ND-1000). O grau de pureza do RNA foi avaliado com base na razão entre as leituras de 260 e 280nm, uma vez que valores superiores a 1,8 para essa relação sugerem que o RNA está essencialmente puro e passível de ser usado na maioria dos procedimentos de manipulação genética.

3.4 Microarranjos de cDNA (*cDNA microarrays*)

3.4.1 Desenho experimental

O cDNA de todas as amostras foi hibridizado com um cDNA referência composto por 15 linhagens celulares (Tabela 1). Foi realizado o “dye-swap” que consiste na hibridização de uma amostra duas vezes, usando a inversão de corantes (Figura 2). A inversão dos fluoróforos é realizada para minimizar erros decorrentes das propriedades específicas de cada cianina (Cy3 e Cy5) que apresentam afinidade distintas na síntese de primeira fita do cDNA a partir do RNA.

Tabela 1 - Linhagens celulares selecionadas para compor a referência

Linhagem	Descrição
Daudi	Linfoma de Burkitt
DLD-1	Adenocarcinoma de Cólon
DU 145	Carcinoma de Próstata
FaDU	Carcinoma Epidermóide de Faringe
GM 637	Fibroblasto
H 1080	Fibrossarcoma
H 146	Carcinoma de Pulmão
HB4 α	Célula Luminal de Mama
HEK 293	Human Embryonary Kidney
Jurkat	Leucemia Aguda de Células T
Saos-2	Osteossarcoma
SK-BR-3	Adenocarcinoma de Mama
SK-MEL-28	Melanoma
T24	Carcinoma de Bexiga
T98G	Glioblastoma

Figura 2. Esquema representando o desenho experimental de inversão de corantes (*dye swap*)

3.4.2 LÂMINA 4.8K002

A plataforma usada na montagem dessa lâmina é de vidro contendo 4.608 seqüências de cDNA de ORESTES (Dias Neto et al., 2000), originárias do Projeto Genoma do Câncer (Instituto Ludwig/FAPESP), correspondentes a diferentes genes humanos, além de 192 controles positivos e negativos. Essa plataforma foi produzida pelo grupo do Dr. Luiz Fernando Lima Reis (LABRI – Hospital A.C. Camargo). A lâmina é dividida em 48 sub-arrays, cada um contendo 100 spots. Cada spot corresponde a um ponto na lâmina de microarray onde estão imobilizadas as seqüências de ORESTES. As seqüências imobilizadas na plataforma seguiram critérios biológicos e físicos, determinados pela Dra. Helena Brentani (LBHC), tais como:

- Seqüências ORESTES correspondentes a seqüências de full-length.

- Sequências ORESTES com tamanho maior que 300 pares de base.
- Uniformidade de conteúdo GC.
- Sequências ORESTES com sequência mais a 3' possível, considerando-se a variabilidade da região 3' UTR devido ao sítio de poliadenilação alternativo.
- Nenhuma sequência deve ser compartilhada entre transcritos a qual apresente identidade maior de 85% em 100 pb.

Dos 4.608 genes representados, 2.134 genes têm função conhecida divididos em 802 classes funcionais segundo o *Gene Ontology Consortium Annotation* (GO). Dos genes com função conhecida, 287 genes foram distribuídos na classe de regulação da transcrição, 202 genes na classe de transdução de sinal, 177 genes na classe de fosforilação de aminoácidos e proteínas e 100 genes na classe de transporte, além de outras ontologias. A classificação usada é redundante, ou seja, o mesmo gene pode ter sido colocado em mais de uma classe funcional, conforme sua caracterização.

3.5 Marcação e Hibridização

O cDNA marcado foi gerado através de uma reação de transcriptase reversa utilizando 7,0 µg de RNA amplificado da amostra teste ou 5,0 µg de RNA amplificado da referência, 1,2 µl de um controle 1X (Q-gene)^{**} que hibridiza com um *spot* específico presente na plataforma, 3,0 µl de *random primer* 3,0 µg/µl (*Invitrogen Life Technologies*, Carlsbad, CA) em um volume

total de 11,2 µl. A reação foi submetida à temperatura de 70°C por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 6,0 µl de Improm™ II 5X Reaction Buffer (*Promega*), 7,7 µl de MgCl₂ 25 mM (*Promega*), 0,5 µl RNaseIN (*Promega*), 0,6 µl Low C dNTP mix (dATP 25mM, dGTP 25mM, dTTP 25mM e dCTP 10 mM), 2,0 µl de dCTP Cy3 ou de Cy5 25mM (*Amersham, Biosciences*), que consiste numa solução de citosinas ligadas a um fluoróforo e 2,0 µl ImProm-II™ Reverse Transcriptase (*Promega*). A reação permaneceu a 42°C por duas horas. Para a degradação do aRNA foi acrescentado 1,5 µl EDTA 0,5M e 1,5 µl NaOH 1M, e a reação foi submetida a 70°C por 20 minutos e finalmente neutralizada com 1,5 µl HCl 1M.

Para a eliminação de não-incorporados e resíduos de reação, passou-se a solução numa coluna de purificação, denominada AutoSeq G50 (*Armesthan Pharmacia*), conforme recomendações do fabricante. Após purificação, a amostra e sua referência são misturadas e acrescidas de 2,0 µl de poliA DNA 2,0 µg/ µl (*Armesthan Pharmacia*), 4,0 µl Cot 1 DNA 1,0 µg/ µl (*Invitrogen*) e 2,0 µl de BSA 10 mg/ml (*Sigma*). O volume foi ajustado para 12,35 µl e em seguida, foi adicionado 47,5 µl de tampão de hibridização 1X (Cloreto de sódio 0,3M, Nitrato de sódio 0,03M, dodecilsulfato de sódio 0,1%) previamente aquecido a 70 °C, 23,75 µl de formamida deionizada (*SIGMA*), 9,5 µl de Denhardt's 50X (Ficoll 1%, Polivinilpirolidona 1%, soro fetal bovino 1%) e 2,0 µl de DNA de esperma de salmão 5,0 µg/µl para um volume final de reação de 95 µL. A solução final foi aquecida a 95 °C por 5 minutos para total desnaturação das fitas e aplicadas na estação de hibridização, cujas lâminas foram previamente hibridizadas a 42 °C (de 6-

16h) em tampão contendo SSC 5X (Cloreto de sódio 0,75M, nitrato de sódio 75mM), dodecilsulfato de sódio (SDS) 0,2%, soro fetal bovino (BSA) 1%, solução de Denhardt's 5X e lavadas em água destilada, sendo então montada na estação GeneTac 2000 (*Genomic Solutions*).

Cada amostra teste e referência foram marcadas em duplicata, utilizando o sistema inverso de incorporação dos corantes (*dye swap*) com os fluoróforos Cy3 e Cy5.

O processo de hibridização foi realizado a 42 °C por no mínimo 16hs e no máximo 24hs na estação *GeneTac* 2000 (*Genomic Solutions*). Como a hibridização é competitiva, os valores de fluorescência obtidos revelam níveis relativos de expressão de cada transcrito na amostra-teste comparada com a amostra-referência. Após hibridização, as lâminas passaram por um processo de lavagem no qual os tampões são pré-aquecidos a 42° C. As lâminas são lavadas nas seguintes condições: uma vez em solução SSC 2X, duas vezes em solução de SSC 0,1% e SDS 1X e duas vezes em solução de SSC 0,1%, sendo que todos os passos são realizados sob agitação por 10 minutos, centrifugando-se as lâminas em tubo Falcon 50 µl a 1.000 rpm por 2 minutos para secagem.

^{**} 1,0 ul da mistura do mRNA controles 1X contém: Q do fago λ "landmark" na concentração de 45 ng/ul; Clone de *B. subtilis* trp gene (ATCC, 87485) 30 ng/ul; Clone de *B. subtilis* dapB gene (ATCC, 87485) 15 ng/ul; Clone de *B. subtilis* thrB gene (ATCC, 87485) 3 ng/ul; Clone de *B. subtilis* pheB gene

(ATCC, 87485) 1,5 ng/ul; Clone de *B. subtilis* lysA gene (ATCC, 87485) 0,3 ng/ul.

3.6 Captura das imagens e quantificação do sinal

Os sinais gerados pela hibridização das amostras foram capturados utilizando um scanner a laser confocal com canal duplo, o *ScanArrayTM Express* (*Perkin Elmer Life Sciences, Inc., EUA*), usando PMT 60% para ambos os canais (*Photomultiplier voltage*). Esse sistema tem dois lasers com comprimento de ondas diferentes, que estimulam especificamente o Cy3 ou o Cy5 (Tabela 2). Quando as moléculas são excitadas, emitem um sinal proporcional ao número de moléculas presentes, que é captado pelo scanner. A quantificação desse sinal ocorre devido à conversão do comprimento de onda emitido pelos fluoróforos excitados em energia elétrica, produzindo um sinal mensurável. A leitura dos fluoróforos é feita separadamente e a composição da imagem é realizada pelo programa. Cada lâmina de microarray gera duas imagens diferentes, uma para cada fluoróforo utilizado. Geralmente, uma pseudocoloração referente à composição das duas imagens (Cy3 –verde e Cy5 – vermelho) é utilizada para facilitar a visualização e verificação da qualidade dos experimentos. Os dados foram recuperados pelo *ScanArray* (*Perkin Elmer Life Sciences, Inc., EUA*). Esse programa permite a localização automática dos pontos de cDNA hibridizados na lâmina baseando-se em marcadores de posição,

necessitando checagem e ajuste manual. O programa realiza o cálculo da intensidade de cada ponto de hibridização para cada uma das amostras.

Tabela 2 - Características específicas de cada fluoróforo utilizado

Fluoróforo	Excitação (nm)	Emissão (nm)	Coloração
Cy3	550	570	Verde
Cy5	649	670	Vermelho

3.7 Pré-Análise das Lâminas Hibridizadas

Após a captura de sinal pelo *scanner*, os resultados foram submetidos a algumas análises de qualidade, que são denominadas de pré-análise e estão apresentadas a seguir.

3.7.1- MA-plot e Box-plot

Fez-se a representação da fluorescência de todos os genes de uma lâmina, mostrando a relação da intensidade bruta da lâmina (Cy3/Cy5), onde as cores em vermelho ou em verde representam pontos que estão mais expressos ou menos expressos que a referência, respectivamente. Construímos boxplots representando a dispersão de pontos de cada sub-array (1 sub-array contém 100 spots). Os *Box plots* consistem de caixas com uma linha central (mediana dos dados) e duas caudas, a superior representando o percentil 75 e a inferior, representando o percentil 25.

Lâminas que apresentam Box plots de algum subarray muito diferentes dos demais devem ser olhadas com cuidado podendo significar problemas na lâmina ou hibridização. Foram medidos os valores de intensidade de fluorescência para cada gene, após a subtração de sinal do *background* usando escala *log* na base 2. Um *MA plot* cartesiano foi construído com *M* na coordenada e *A* na abcissa, onde $M = \log_2 (R/G)$ e $A = \log_2 (\sqrt{R \times G})$. O *MA plot* nos dá uma idéia da diferença de expressão bruta da amostra contra a referencia e da variação destas razões de acordo com as intensidades.

Também é muito importante se levar em conta quantos pontos da lâmina estão sendo levados em consideração na análise final. Primeiramente, foram eliminados todos os pontos da lâmina que apresentaram emissão de fluorescência igual ou menor (outliers) que o sinal emitido pelo ruído (background). Para esse cálculo, foi usado o valor de intensidade do background e o desvio-padrão calculado a partir da fluorescência emitida por cada spot (subtração local). Foram eliminados também os pontos que apresentaram saturação de hibridização, sendo esse dado baseado numa emissão de sinal maior ou igual a 63000 ($65550 = 16 \text{ BIT}$). Nesse caso, o excesso de material hibridizado gera um sinal muito intenso que supera a capacidade do detector de medir a intensidade proporcional de fluorescência, invalidando a quantificação. Plotamos um gráfico cartesiano em que pontos em azul representam genes que foram excluídos pelo programa *Scannarray* ou manualmente.

3.7.2 Distribuição dos Valores de Coeficiente de Correlação de *Pearson*

A correlação entre a lâmina controle e a lâmina *swap* foi avaliada através de uma correlação de *Pearson*, levando em consideração a eficiência de incorporação dos fluoróforos (Cy3 e Cy5). A correlação de *Pearson* determina uma medida do grau de correlação linear entre duas variáveis aleatórias. Para uma lâmina ser considerada de boa qualidade, essa correlação tem que ser superior a 80% após a normalização.

3.7.3 Normalização das Lâminas

A proposta de normalização é minimizar variações sistemáticas introduzidas experimentalmente nas medidas da expressão gênica, para que as diferenças biológicas quantificadas possam ser distinguidas com menos artefatos. A normalização por *Lowess* (LOWESS – *Locally Weighted Scatterplot Smoothing*) foi utilizada neste projeto. Para cálculo do *Lowess* definem-se janelas com intervalos pré-definidos, que variam de 0 a 100%. Nesse projeto, foi utilizado intervalo de 20%, ou seja, a análise de regressão foi realizada com 20% dos pontos ao redor do ponto em questão

3.8 Análise matemática e estatística

As análises matemáticas foram realizadas com lâminas que apresentaram qualidade satisfatória em todos os itens da pré-análise.

3.8.1 Identificação dos genes diferencialmente expressos na plataforma universal 4.8K

Para identificar os genes diferencialmente expressos entre os grupos de interesse foi aplicado o teste estatístico ANOVA ($p < 0.05$) seguido pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

A clusterização hierárquica usando os genes diferencialmente expressos foi realizada baseada na distância Euclidiana e average linkage. A robustez da clusterização foi avaliada pela técnica de *Bootstrap* com 1000 permutações usando o programa TMEV.

Os genes foram classificados de acordo com processos biológicos através do GO. Para avaliação da representatividade significativa dos processos biológicos no grupo de genes diferencialmente expressos foi usado o Web-based Gene Set Analysis Toolkit (WebGestalt) - <http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt> (Zhang et al., 2005). Processos biológicos com P valor $< 0,05$ foram considerados significantes.

3.8.2 Construção de classificadores

Foram buscados classificadores que pudessem separar dAD, pAD e N. Como o número de amostras era pequeno, a busca de um classificador podia cair facilmente em um classificador específico para a amostra em questão (*overfitting*), tornando a generalização do classificador muito difícil. Para evitar, ao máximo, o *overfitting*, foram construídos classificadores

simples, neste caso lineares, com três genes. Foram procurados, também, classificadores que apresentassem as menores estimativas de erro segundo Kim et al. (2002), e Braga-Neto e Dougherty (2004). A técnica de *bolstered error* foi especialmente desenvolvida para lidar com amostras pequenas, situação típica de experimentos de *microarrays*. Normalmente, essa técnica apresenta variância e desvios menores que técnicas utilizadas para estimar erro como *cross validation* e *leave-one-out*. Para diminuir o tempo computacional necessário para analisar todas as combinações de triplas possíveis, foi usada uma técnica de pré-processamento baseada em uma técnica de aprendizado de máquina chamada *Support Vector Machine*, modificada como descrita por Silva et al. (2005). Depois desta fase de pré-processamento, onde se efetua uma redução da dimensionalidade do espaço de características a partir de 200 genes, foram buscadas todas as combinações de triplas possíveis, sendo que as melhores foram definidas como tendo o menor erro estimado e a maior distância do plano classificador.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização das amostras selecionadas

As amostras selecionadas para esse trabalho provieram de mais de 170 casos, coletados entre os anos de 2005 e 2007, nos quais foram executados seus respectivos diagnósticos, neuropatológico e clínico. Desses casos, foram selecionadas 64 amostras representadas por duas regiões cerebrais – córtex frontal e hipocampo - correspondentes a 32 indivíduos divididos em quatro grupos:

❖ **Grupo 1 (dAD):** indivíduos com DA no exame anátomo-patológico (Braak = IV / V / VI e CERAD $\neq$ 0) e com comprometimento cognitivo (CDR $\geq$ 1) (Tabela 3);

Tabela 3 – Características das amostras selecionadas para o grupo dAD

Amostra	Sexo	IdADe	Diagnóstico		
			Neuropatológico		Clínico
			Braak	CERAD	CDR
dAD1	F	94	IV	ND	2
dAD2	F	82	IV	B	2
dAD3	F	86	IV	C	1
dAD4	F	83	V	A	3
dAD5	M	69	VI	C	2
dAD6	F	87	V	B	3
dAD7	F	82	V	ND	2
dAD8	F	77	IV	ND	3
dAD9	F	83	VI	C	3

F: feminino; M: masculino; ND: não determinado

❖ **Grupo 2 (pAD):** indivíduos com DA no exame anátomo-patológico (Braak = IV / V / VI e CERAD $\neq$ 0) e sem comprometimento cognitivo (CDR=0) (Tabela 4);

Tabela 4 - Características das amostras selecionadas para o grupo pAD

Amostra	Sexo	IdADe	Diagnóstico		
			Neuropalógico		Clínico
			Braak	CERAD	CDR
pAD1	F	87	V	C	0
pAD2	F	85	V	C	0
pAD3	F	99	VI	B	0
pAD4	F	80	IV	ND	0
pAD5	F	86	IV	C	0

F: feminino; M: masculino; ND: não determinado

❖ **Grupo 3 (OD):** indivíduos sem DA no exame anátomo-patológico (Braak = 0 / I / II e CERAD $\neq$ C) e com comprometimento cognitivo (CDR $\geq$ 1) (Tabela 5);

Tabela 5 - Características das amostras selecionadas para o grupo OD

Amostra	Sexo	IdADe	Diagnóstico		
			Neuropalógico		Clínico
			Braak	CERAD	CDR
OD1	M	73	I	0	2
OD2	M	80	II	A	1
OD3	M	88	II	B	2
OD4	M	61	0	0	1
OD5	F	89	0	0	3
OD6	M	78	II	A	3
OD7	F	76	0	ND	2
OD8	F	85	I	0	3
OD9	F	83	0	ND	1

F: feminino; M: masculino; ND: não determinado

❖ **Grupo 4 (N):** indivíduos sem DA no exame anátomo-patológico e (Braak = 0/ I / II e CERAD ≠ 0) e sem comprometimento cognitivo (CDR=0) (Tabela 6).

Tabela 6 - Características das amostras selecionadas para o grupo N

Amostra	Sexo	IdADE	Diagnóstico		
			Neuropalológico		Clínico
			Braak	CERAD	CDR
N1	F	71	0	0	0
N2	M	79	I	0	0
N3	F	81	I	0	0
N4	M	77	I	A	0
N5	M	57	0	0	0
N6	F	65	0	0	0
N7	F	59	0	0	0
N8	M	89	II	0	0
N9	F	82	0	0	0

F: feminino; M: masculino; ND: não determinado

No grupo dAD, a idade variou entre 69 e 94 anos, apresentando uma média de 82,5 anos; no grupo pAD, a idade variou entre 80 e 99 anos, com média de idade igual a 87,4 anos; no grupo OD, a variação da idade foi entre 61 e 89 anos, com média de 79,2 anos; e, no grupo N, a idade variou de 57 a 89 anos, apresentando média de 73,3 anos. A média geral das idades foi de 79,8 anos. É importante notar que os grupos dAD e pAD são formados, quase que exclusivamente, por mulheres, uma vez que somente uma amostra é de paciente do sexo masculino.

4.2 RNA Total e RNA amplificado

O RNA total foi extraído utilizando o *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN), sendo que a integridade do RNA total de todas as amostras foi verificada no *Bioanalyzer 2100* (Agilent), aparelho com sensibilidade para analisar quantidades de RNA da ordem de picogramas (Figura 3).

Figura 3. Perfil do RNA total analisado no Bioanalyzer. 1) OD1F, 2) OD1H, 3) OD2F, 4) OD2H, 5) dAD1F, 6) dAD1H, 7) OD4F, 8) OD4H, 9) OD4H' e 10) dAD3F. L: ladder, F: córtex frontal, H: hipocampo

As 64 amostras selecionadas apresentaram RNA total de boa qualidade. Esta avaliada: a) pelo RIN, apresentando valores > 4 ; b) pela visualização das bandas dos RNAs ribossomais 18S e 28S; e c) pelo grau de pureza com base na razão entre as leituras de 260 e 280nm ($> 1,8$) (Tabela 7). Para as amostras que, após extração, não atenderam aos critérios acima, ou apresentaram quantidade inferior a 1,0 μg , o RNA total foi re-extraído até que todas as amostras apresentassem qualidade e quantidade suficiente para os experimentos seguintes.

Todas as amostras foram amplificadas, utilizando-se uma metodologia que se baseia na síntese de primeira fita de cDNA utilizando o iniciador oligo dT-T7 que carrega um sítio de reconhecimento da RNA polimerase permitindo a transcrição *in vitro*. Essa amplificação é realizada em dois *rounds* para um maior rendimento final em massa de RNA. A qualidade dos RNAs amplificado foi analisada utilizando-se o *Bioanalyzer* (Figura 4). Essa análise é realizada para identificar amplificações com qualidade suficiente para experimentos de *microarray*.

Figura 4. Perfil do RNA amplificado analisado em *Bioanalyzer*. L – ladder; 1) dAD9F, 2) dAD9H, 3) pAD5F, 4) pAD5H, 5) pAD3F, 6) pAD3H, 7) N6F, 8) N6H, 9) dAD8F, 10) dAD8H, 11) N2H, 12) RNA referência

O RNA amplificado das amostras concentrou-se em uma faixa de tamanho entre 200 pb e 500 pb (Figura 5A), apresentando o padrão esperado quando utilizamos o nosso protocolo de amplificação. Já para o RNA referência, o tamanho dos fragmentos de RNA gerados foi maior, concentrando-se em uma faixa de 200 pb a 1000 pb (Figura 5B). Fragmentos maiores refletem uma melhor qualidade de hibridização, assim,

a massa utilizada de RNA referência foi menor que a usada para as amostras na hibridização para compensar o menor tamanho dos RNAs das amostras.

Figura 5. Eletroferograma mostrando a distribuição do tamanho dos fragmentos gerados pela amplificação do RNA mensageiro. A) Perfil do RNA das amostras. B) Perfil do RNA referência. [nt] – nucleotídeos

Todas as amplificações realizadas apresentaram massa acima de 15µg (Tabela 7), quantidade suficiente para realizar a marcação em sistema *dye swap*. A média das massas obtida pela amplificação das amostras foi de 48,05 µg.

Tabela 7 - Dados referentes ao RNA total e RNA amplificado

Amostra	Região	RNA Total			RNA amplificado	
		Massa (µg)	R 260/280	RIN	Massa (µg)	R 260/280
dAD1	F	5,51	2,00	8,00	58,99	2,32
	H	4,62	2,04	8,20	51,99	2,33
dAD2	F	6,52	2,08	9,10	20,12	2,22
	H	1,51	1,92	9,70	48,17	2,18
dAD3	F	8,10	2,07	8,70	56,92	2,23
	H	6,51	1,81	8,10	57,88	2,13
dAD4	F	2,96	2,09	7,00	89,78	2,03
	H	3,06	2,07	6,50	94,74	2,01
dAD5	F	2,64	2,09	7,60	75,14	2,04
	H	2,53	2,03	7,00	90,02	2,04
dAD6	F	5,56	2,05	5,60	32,46	2,25
	H	5,96	2,06	6,10	22,88	2,23
dAD7	F	4,27	2,04	5,50	33,29	2,23
	H	1,31	1,99	6,50	37,29	2,27
dAD8	F	7,11	2,09	6,40	38,50	2,10
	H	8,39	2,07	6,20	38,69	2,01
dAD9	F	2,22	1,82	6,50	50,22	2,30
	H	7,95	1,84	5,40	61,38	2,29
pAD1	F	2,19	1,80	5,70	63,77	2,22
	H	3,21	1,82	6,50	33,42	2,24
pAD2	F	9,63	1,88	7,40	44,17	2,22
	H	2,01	1,80	8,00	47,40	2,20
pAD3	F	1,89	2,14	6,00	30,13	1,94
	H	1,77	2,20	6,40	38,32	1,95
pAD4	F	3,55	2,05	6,00	37,56	2,15
	H	4,39	2,04	5,90	20,10	2,08
pAD5	F	7,44	1,85	6,10	62,40	2,28
	H	1,88	1,80	6,20	41,29	2,28
OD1	F	1,86	2,03	8,30	31,00	2,31
	H	4,32	2,06	6,20	37,70	2,31
OD2	F	5,82	2,06	8,60	47,77	2,34
	H	2,78	2,05	8,10	23,25	2,34
OD3	F	8,93	2,06	8,10	42,50	2,06
	H	11,70	1,86	8,20	71,30	2,09
OD4	F	3,11	2,08	8,80	48,02	2,31
	H	5,39	2,03	8,00	52,05	2,30

Amostra	Região	RNA Total			RNA amplificado	
		Massa (µg)	R 260/280	RIN	Massa (µg)	R 260/280
OD5	F	3,51	1,83	6,80	25,54	2,19
	H	1,86	1,82	7,20	40,42	2,18
OD6	F	1,59	1,94	9,80	43,96	2,21
	H	2,02	1,89	7,40	51,89	2,18
OD7	F	4,61	2,10	7,80	33,85	1,89
	H	2,57	2,14	6,70	40,05	1,92
OD8	F	1,71	2,03	6,90	31,37	1,90
	H	3,46	2,13	6,50	30,63	1,88
OD9	F	3,35	2,06	6,20	66,46	2,14
	H	2,33	2,05	7,50	81,10	2,02
N1	F	2,43	1,80	5,60	43,06	2,22
	H	5,28	1,85	6,00	42,10	2,22
N2	F	3,59	2,09	6,50	37,07	1,90
	H	3,78	2,12	7,60	36,21	1,92
N3	F	9,54	1,80	7,60	43,09	2,21
	H	4,53	1,81	5,20	40,67	2,21
N4	F	8,32	2,06	6,70	45,51	1,90
	H	3,57	1,98	7,10	27,15	1,88
N5	F	2,76	1,92	4,60	54,81	2,24
	H	1,35	1,88	7,60	55,68	2,22
N6	F	8,06	2,04	6,90	40,92	1,94
	H	7,19	2,05	6,20	38,56	1,91
N7	F	2,67	1,80	7,10	43,86	2,21
	H	1,38	1,8	8,20	28,49	2,18
N8	F	4,21	2,08	7,60	76,42	2,02
	H	3,08	2,06	7,80	135,41	2,00
N9	F	4,30	1,98	5,60	68,82	1,99
	H	3,19	2,02	6,80	41,57	2,15

F: córtex frontal, H: hipocampo

4.3 Marcação e Hibridização

Sete microgramas do RNA amplificado de cada uma das amostras testes e 5,0 μ g da mesma molécula da amostra referência foram utilizadas para síntese de cDNAs marcados com os fluoróforos Cy3 e Cy5, que, posteriormente, foram hibridizados na lâmina 4.8K. Na Figura 6, está representado o resultado da hibridização de uma das amostras na plataforma utilizada.

Figura 6. Representação da lâmina 4.8K hibridizada com amostra marcada com Cy3, referência com Cy5 e imagem sobreposta, respectivamente

4.4 Qualidade das lâminas

As amostras marcadas e hibridizadas apresentaram boa qualidade. Os box-plots das diferentes lâminas se mostraram centrados no mesmo zero (Figura 7A) e os MA-plots das lâminas individuais mostraram variação da razão segundo a intensidade como esperado (Figura 7B). O background local mais 2 Desvios Padrões foram subtraídos da intensidade de todos os pontos de cada lâmina individual. Se o resultado era negativo, o ponto era retirado (Figura 7C e D).

Figura 7. Análise da qualidade das lâminas hibridizadas. A) Box-Plot - Representa a dispersão de pontos lâmina. O bloco verde representa a concentração de 75% dos pontos, segundo a razão de intensidade. B) MA plot- gráfico representando a razão (Cy3/Cy5) no eixo y e média das intensidades dos corantes em escala logarítmica no eixo x. Os pontos em azul/cinza representam os *spots* que apresentaram sinal menor que o sinal do *background*. C) Relação da intensidade bruta da lâmina (Cy3/Cy5). As cores em vermelho ou em verde representam pontos que foram retirados da análise. D) Gráfico representativo da lâmina. Pontos em azul representam genes que foram excluídos pelo programa *Scannarray* ou manualmente

Depois, olhamos para o número total de pontos retirados em cada lâmina pela baixa intensidade do sinal. Optamos em não descartar nenhuma lâmina, apesar de algumas apresentarem número de pontos válidos para análise menor que a média mais dois desvios padrões do conjunto total de lâminas (Figura 8). Pela dificuldade de conseguir o material que satisfizesse todos os critérios de inclusão, trabalhamos com lâminas com até 3800 pontos aproveitados (mediana de 4600 em uma lâmina com 4800 pontos). No entanto, é bom salientar que 75% das lâminas apresentaram aproveitamento maior que 4400 pontos (spots).

Figura 8. Representação da dispersão da quantidade de spots aproveitados para análise. A caixa azul representa a concentração de 50% do aproveitamento de pontos, onde há uma linha central (mediana dos dados) e duas caudas, a superior representando o percentil 75 e a inferior, representando o percentil 25

Quanto a avaliação da inversão de corantes (*dye swap*) não obtivemos nenhuma lâmina com correlação de Pearson menor que 0,7, como visto na Figura 9.

Figura 9. Representação da dispersão da Correlação de *Pearson* entre as lâminas controle e lâminas *swap*. A caixa azul representa a concentração de 50% das correlações, onde há uma linha central (mediana dos dados) e duas caudas, a superior representando o percentil 75 e a inferior, representando o percentil 25

Na figura abaixo (Figura 10), podemos ver o resultado do MM-plot para um par de lâminas antes e depois da normalização, mostrando que a inversão de corantes não trouxe grandes alterações para os nossos resultados.

Figura 10. Gráfico MM-Plot mostrando a qualidade de correlação entre a lâmina controle e a lâmina *swap* avaliada através de correlação de *Pearson* antes da normalização (A) e após a normalização (B)

4.5 Identificação de Genes Diferencialmente Expressos entre os quatro grupos do estudo para as amostras de hipocampo e córtex frontal

Primeiramente, foi analisado o padrão geral de expressão gênica nos quatro diferentes grupos de amostras. Visando encontrar genes diferencialmente expressos (GDEs) entre dois fatores principais – sinais clínicos de demência (presença ou ausência) e patologia da DA (presença ou ausência) – foi aplicado o teste ANOVA 2x2. Para esta análise, foram comparadas todas as amostras, tanto de hipocampo quanto do córtex frontal. A comparação desses grupos resultou na seleção de 303 GDEs

($p < 0,05$). Em seguida, a partir desses 303 genes, o teste de Tuckey ($p < 0,05$) foi realizado, resultando em seis combinações diferentes. O número de GDEs obtidos em cada combinação está mostrado na Figura 11. A lista dos GDEs obtidos pelo teste de Tuckey, a partir dos 303 genes da ANOVA, pode ser visualizada no Anexo A.

Figura 11. Número de genes diferencialmente expressos obtidos pelo teste de Tuckey ($p < 0,05$). As colunas azuis (à esquerda) mostram o número de genes significativos independentemente se eles ocorreram em outra combinação. As colunas verdes (à direita) representam o número de genes significativos que exclusivamente ocorreram em cada combinação

Para avaliação do nível de similaridade molecular entre os diferentes grupos, a distância dos quatro grupos foi medida usando o número de GDEs como a medida da distância. Em outras palavras, quanto maior o número de GDEs entre um tipo de amostra e todas as outras três, mais distante a amostra foi situada e, conseqüentemente, mais molecularmente divergente (Figura 12).

Figura 12. Esquema representativo mostrando a distância (número de genes diferencialmente expressos exclusivos de cada combinação) entre os grupos dAD, pAD, OD e N

Uma clusterização hierárquica foi feita para verificar o padrão de expressão dos 303 genes obtidos pela ANOVA (Figura 13). A clusterização separou as amostras, com 100% de suporte, em dois clusters, tendendo a separar em um cluster os grupos dAD e pAD, e no outro cluster os grupos OD e N. No cluster dAD / pAD, ficaram 64,29% das amostras dAD e pAD. No cluster OD / N, ficaram 83,33% das amostras OD e N.

Figura 13. Clusterização hierárquica dos valores de expressão de 64 amostras [32 hipocampus (H) e 32 córtex frontais (F)]. A) A clusterização foi realizada com os valores de expressão dos genes obtidos pela ANOVA (303 genes). Cada linha representa um único gene e cada coluna uma amostra (■ dAD, ■ pAD, ■ OD, ■ N). Vermelho indica maior expressão, verde menor expressão, preto sem alteração no nível de expressão comparado à amostra referência. B) Legenda do suporte do cluster

Foi realizada outra análise estatística, *Significance Analysis of Microarray* (SAM), entre os quatro grupos, aceitando um gene como falso positivo em cada vinte [*False Discovery Ratio* (FDR) = 0,05]. Foram obtidos 33 GDEs, sendo que todos estes foram diferencialmente expressos na ANOVA 2X2. Na Figura 14, a clusterização hierárquica com esses genes mostra que há tendência, também, em separar os grupos OD e N dos grupos dAD e pAD. No cluster dAD / pAD, ficaram 71,43% das amostras dAD e pAD. No cluster OD / N, ficaram 91,67% das amostras OD e N.

Figura 14. Clusterização hierárquica dos valores de expressão de 64 amostras [32 hipocampus (H) e 32 córtex frontais (F)]. A) A clusterização foi realizada com os valores de expressão dos genes obtidos pelo SAM (33 genes). Cada linha representa um único gene e cada coluna uma amostra (■ dAD, ■ pAD, ■ OD, ■ N). Vermelho indica maior expressão, verde menor expressão, preto sem alteração no nível de expressão comparado à amostra referência. Cinza indica que nenhuma intensidade de sinal foi detectada. B) Legenda do suporte do cluster

O padrão de expressão das amostras hipocâmpais e das amostras de córtex frontal foram, também, avaliadas separadamente.

Para as amostras do córtex frontal, foi realizado o teste ANOVA 2x2 considerando os quatro grupos do estudo. A comparação desses grupos resultou na seleção de 163 GDEs ($p < 0,05$).

A partir desses 163 genes, o teste de Tuckey ($p < 0,05$) foi realizado através de comparações a cada dois grupos, resultando em 6 combinações diferentes. A lista dos 163 genes com as comparações entre os grupos pode ser visualizada no Anexo B.

Uma clusterização hierárquica foi realizada baseada na expressão dos 163 genes (Figura 15). A clusterização não foi capaz de discriminar os grupos de amostras.

Figura 15. Clusterização hierárquica dos valores de expressão de 32 amostras de córtex frontal (F). (A) A clusterização foi realizada com os valores de expressão dos genes obtidos pela ANOVA (163 genes). Cada linha representa um único gene e cada coluna uma amostra (■ dAD, ■ pAD, ■ OD, ■ N). Vermelho indica maior expressão, verde menor expressão, preto sem alteração no nível de expressão comparado à amostra referência. B) Legenda do suporte do cluster

Para as amostras de hipocampo, os GDEs foram buscados através do teste ANOVA 2x2 ($p < 0,05$), resultando na seleção de 177 genes. A partir desses 177 genes, o teste de Tuckey foi realizado. A lista dos 177 genes com as comparações entre os grupos pode ser visualizada no Anexo C.

Uma clusterização hierárquica foi realizada baseada na expressão dos 177 genes (Figura 16). Essa clusterização foi capaz de discriminar, com 100% de suporte, as amostras hipocampais dos grupos dAD e pAD das amostras dos grupos N e OD. Somente uma amostra do grupo OD (OD9H) e uma amostra do grupo N (N9H) segregaram com o cluster dos grupos dAD e pAD, enquanto que três casos do grupo pAD (pAD3H, pAD1H, pAD2H) e 1 caso do grupo dAD (dAD2H) ficaram junto com o cluster dos grupos OD e N.

Figura 16. Clusterização hierárquica dos valores de expressão de 32 amostras de hipocampo (H). A) A clusterização foi realizada com os valores de expressão dos genes obtidos pela ANOVA (177 genes). Cada linha representa um único gene e cada coluna uma amostra (■ dAD, ■ pAD, ■ OD, ■ N). Vermelho indica maior expressão, verde menor expressão, preto sem alteração no nível de expressão comparado à amostra referência. B) Legenda do suporte do cluster

4.6 Aspectos Funcionais dos Genes Diferencialmente Expressos

Para esta análise, foram utilizados os GDEs (teste de Tuckey; $P < 0,05$), considerando todas as amostras (córtex frontal e hipocampo). Na comparação entre dAD e N, genes envolvidos no metabolismo de A β (BACE1), metabolismo de lipídeos (OSB, ACLY, ACSL5), sinaptogênese (SPOCK2), apoptose (SGK, PRKCE), dano na DNA (CRY2, EDD1, GTF2H1), ciclo celular (PCTK1, MYC, CDC16, RCBTB1, DNAJA2, PARD3, EML4, GTF2H1, TCF19, MAPRE1) e ligação ao íon cálcio (HPCAL4, CAPN2, ENTPD6, CELSR1, SPOCK2) estavam diferencialmente expressos. Na comparação entre pAD e N, alguns genes refletindo metabolismo de lipídeos (DPM2), diferenciação de neurônios (PARD3), apoptose (ACTN1), dano no DNA (WRNIP1, GTF2H1, TREX1), ciclo celular (MYC, PARD3, CHFR, GTF2H1), via de sinalização do Wnt (AES) e ligação ao íon cálcio (GALNT14, ACNT1, RAB11FIP3) estavam entre os diferencialmente expressos. Como se pretendia procurar sets de GDEs entre dAD relacionado a N e pAD relacionado a N, foi realizada uma busca, usando a distribuição hipergeométrica, por processos biológicos hiper-representados pelos genes destes grupos, esperando encontrar se os processos biológicos relevantes ($p < 0,05$) em cada combinação seriam os mesmos ou não (Tabela 8). Esta análise mostrou que muitas categorias de processos biológicos hiper-representadas foram similares entre as combinações. Não foi possível obter categorias hiper-representadas significantes nas combinações dAD x pAD e OD x N devido ao pequeno número de GDEs nestas combinações.

Tabela 8 - Categorias de processos biológicos hiper-representados ($p < 0,05$) pelos genes diferencialmente expressos obtidos pelo teste de Tuckey

	Processos Biológicos	Genes
dAD x N	ciclo celular	PCTK1, MYC, CDC16, RCBTB1, DNAJA2, PARD3, EML4, GTF2H1, TCF19, MAPRE1
	ciclo celular mitótico	CDC16, DNAJA2, EML4, MAPRE1
	regulação do ciclo celular	MYC, PCTK1, CDC16, DNAJA2, GTF2H1, TCF19, MAPRE1
	organização celular e biogênese	19 genes
	organização do citoesqueleto	C20orf23, KISS1, ARPC3, MYO6, EML4, MAPRE1, EPB41L2
	transporte intracelular	COG3, C20orf23, TIMM9, LMAN1, ARCN1, SRP9, NUP93, MYO6, ERGIC1
	transporte protéico	COG3, VPS39, TIMM9, LMAN1, ARCN1, SRP9, NUP93
	proliferação celular	MYC, UTP20, EDD1, CDC16, DNAJA2, TCF19, CDV3, MAPRE1
	metabolismo de macromoléculas	38 genes
	polimerização protéica	ARPC3, MAPRE1
	"folding" protéico	TIMM9, LMAN1, DNAJA2, DNAJC5
	modificação protéica	14 genes
	ciclo da ubiquitina	USP20, UBE2L3, CDC16, FBXL15, FBXL10
	metabolismo de aminoglicanos	CHST1, GALNS
pAD x OD	ciclo celular	RAE1, MYC, PLKE, EML4, CHFR, NEK6, GTF2H1, TCF19
	regulação do ciclo celular	MYC, PLKE, NEK6, CHFR, GTF2H1, TCF19
	regulação da mitose	CHFR, NEK6
	proliferação celular	MYC, ATP1F1, KLF11, TCF19, PRDM4, CDV3
	metabolismo de macromoléculas	31 genes
	metabolismo protéico	25 genes
	ciclo da ubiquitina	USP20, UBE2L3, PPIL2, HERC3, CHFR
	biossíntese de compostos nitrogenados	PSAT1, PHGDH, AMD1
	regulação da transcrição da RNA polimerase II	MYC, FOXE1, KLF7, KLF11, TCF19
	regulação negativa da transcrição da RNA polimerase II	FOXE1, KLF11
dAD x OD	processo baseado em microtúbulos	RAE1, KIF20A, EML4
	ciclo celular	PCTK1, MYC, CDC16, PPP2R1A, SLC12A4, EML4, CHFR, RIF1, GTF2H1, TCF19, BCL2
	regulação da progressão do ciclo celular	MYC, PCTK1, CDC6, PPP2R1A, SLC12A4, CHFR, GTF2H1, TCF19, BCL2
	regulação da mitose	CDC16, CHFR
	organização celular e biogênese	22 genes
	organização do citoesqueleto	C20orf23, ARPC3, PLEKHC1, KIF1A, MYO6, EML4, EPB41L2
	processo baseado em filamentos de actina	PLEKHC1, ARPC3, MYO6, EPB41L2
	proliferação celular	MYC, UTP20, CDC16, TCF19, LRP1, CDV3, BCL2, IFI16
	metabolismo de macromoléculas	42 genes
	metabolismo de rRNA	UTP20, EXOSC2, EXOSC1
	modificação protéica	19 genes
	ciclo da ubiquitina	USP20, UBE2L3, CDC16, FBXL15, CHFR, UBE20
	metabolismo lipoprotéico	FNTA, RABGGTA
	indução da apoptose	PPP2R1A, PRKCE, CEBPG, IFI16
	resposta a dano no DNA	CRY2, WRNIP1, CEBPG, RIF1, GTF2H1, IFI16
pAD x N	metabolismo de macromoléculas	19 genes
	glicosilação de aminoácido	DPM2, B3GNT3
	ciclo da ubiquitina	UBE2L3, PPIL2, FBXL10, CHFR
	resposta a dano no DNA	WRNIP1, GTF2H1, TREX1
	adesão célula-matriz	ADAM15, ACTN1
	regulação do metabolismo protéico	SAMD4A, SRP9, ARPC3
	regulação da tradução	SAMD4A, SRP9
	replicação do DNA	WRNIP1, TREX1

4.7 Genes relacionados à Neuropatologia da DA

Com o propósito de identificar genes possivelmente envolvidos com as alterações neuropatológicas da DA, foi feito um diagrama de Venn considerando somente as combinações (dAD x N, pAD x N, dAD x OD e pAD x N) nas quais um grupo tivesse a neuropatologia da DA e o outro grupo não (Braak IV, V, VI e CERAD $\neq$ 0 x Braak 0, I, II e CERAD $\neq$ C). Dessa análise, foram selecionados 7 genes: *actin related protein 2/3 complex, subunit 3*, (ARPC3), *cornichon homolog-Drosophila* (CNIH), *general transcription factor IIH, polypeptide 1* (GTF2H1), *multiple inositol polyphosphate histidine phosphatase, 1* (MINPP1), *v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog-avian* (MYC), *signal recognition particle 9* (SRP9) e *ubiquitin-conjugating enzyme E2L 3* (UBE2L3) (Figura 17).

Figura 17. Diagrama de Venn mostrando a seleção de genes potencialmente envolvidos na neuropatologia da DA. Para sua construção, foram utilizadas as combinações em que um grupo apresentava a neuropatologia da DA (dAD ou pAD) versus um grupo que não apresentava tal patologia (OD ou N).

Posteriormente, foi avaliado se esses genes estavam associados com os estágios de Braak (Figura 18) e com os escores do CERAD (Figura 19), já que tais genes, supostamente, estariam envolvidos com a patologia da doença. Pode-se notar que os valores de expressão dos sete genes avaliados comportam-se de forma diferente em relação aos estágios de Braak e ao CERAD. Os valores de expressão para Braak 0, I, II e para CERAD 0 e A possuem um padrão diferente dos valores para Braak IV, V, VI e para CERAD B e C.

Figura 18. Box-plots dos genes relacionados à neuropatologia da DA, mostrando a associação desses com os estágios de Braak. Para cada gene, o valor de expressão está plotado no eixo y, e os estágios de Braak estão plotados no eixo x

Figura 19. Box-plots dos genes relacionados à neuropatologia da DA, mostrando a associação desses com os escores do CERAD. Para cada gene, o valor de expressão está plotado no eixo y, e os escores do CERAD estão plotados no eixo x

4.8 Genes relacionados à clínica da DA

Para esta análise, foi construído outro diagrama de Venn considerando somente as combinações (dAD x N, dAD x pAD e dAD x OD) em que um grupo tivesse a demência do tipo Alzheimer (dAD) e o outro grupo não possuísse alterações clínicas da doença de Alzheimer (OD, N ou pAD). Dessa análise, foram selecionados dois genes: *kinesin family member 16B* (KIF16B) e *histone acetyltransferase 1* (HAT1). Foram selecionados, também, quatro genes anotados que foram diferencialmente expressos, com exclusividade, na combinação dAD x pAD: *endoplasmic reticulum metalloproteinase 1* (ERMP1), *kin of IRRE like 3-Drosophila* (KIRREL3), *synapse associated protein 1* (SYAP1) and *ZKD family zinc finger C* (ZXDC) (Figura 20). Esses quatro genes são bastante importantes porque discriminam o grupo de indivíduos que possui a clínica da AD (dAD) do grupo de indivíduos que não possui a clínica da DA (pAD), porém, tanto dAD quanto pAD apresentam a neuropatologia da DA.

Figura 20. Diagrama de Venn mostrando a seleção de genes potencialmente envolvidos com a clínica da DA. Para sua construção, foram utilizadas as combinações em que um grupo apresentava as manifestações clínicas DA (dAD) versus um grupo a clínica da DA (OD, N ou pAD)

Subseqüentemente, foi avaliado se estes genes estavam associados com o CDR (Figura 21). Os genes KIF16B e HAT1 mostraram pouca diferença entre os valores de expressão para CDR=0 e CDR $\geq$ 1 (Figura 22A). Entretanto, para os genes ERMP1, KIRREL3, SYAP1 e ZXDC, esta diferença foi maior (Figura 22B).

Figura 21. Box-plots dos genes relacionados à clínica da DA. Para cada gene, o valor de expressão está plotado no eixo y, e os escores de CDR estão plotados no eixo x. (A) Genes encontrados através da intersecção dos genes pertencentes às combinações dAD x N, dAD x OD e dAD x pAD. (B) Genes exclusivamente identificados na combinação dAD x pAD

4.9 Classificadores

Buscando por classificadores que pudessem, completamente, separar indivíduos dAD dos pAD, foi realizado o procedimento de *feature selection* - busca pelos melhores genes capazes de separar as condições desejadas - partindo de todos os genes do *microarray* para construir classificadores lineares. Antes de construir um classificador para dAD a pAD, primeiramente foi realizada a tentativa de discriminar essas condições dos indivíduos normais (N).

A *feature selection* para dAD e N resultou em 19 genes que poderiam ser utilizados na classificação. Um classificador foi identificado compondo os genes *sulfatase 1* (SULF1); *H2A histone family, member Z* (H2AFZ); e uma proteína hipotética LOC348262 (LOC348262), correspondentes às ORESTES BE934588, BE833329 and BE831904, respectivamente (Figura 22).

Figura 22. Discriminador multivariado (três genes) para classificação dos grupos dAD (vermelho) e N (azul)

O próximo passo foi analisar o perfil gênico de pAD x N. Usando o mesmo procedimento de *feature selection*, foram encontrados 18 genes que poderiam ser usados na construção do classificador. Os genes *aminoterminal enhancer of split* (AES), ORESTES BE703422; *RAB11A, member RAS oncogene family* (RAB11A), ORESTES BF993632; e BF329787, uma ORESTES não anotada, foram o melhor trio para, corretamente, classificar as amostras pAD das amostras N (Figura 23).

Figura 23. Discriminador multivariado (três genes) para classificação dos grupos pAD (vermelho) e N (azul)

Finalmente, foi encontrado, entre um set de 12 genes selecionados pela *feature selection*, o melhor trio para separar dAD de pAD: SYAP1, ORESTES BE006210; RAE1 RNA export 1 homolog (*S. pombe*) (RAE1), ORESTES AW881364; e yrdC domain containing (*E. coli*) (YRDC), ORESTES BF763877 (Figura 24).

Figura 24. Discriminador multivariado (três genes) para classificação dos grupos pAD (vermelho) e N (azul)

5 DISCUSSÃO

5.1 Qualidade das amostras selecionadas

A acurácia da avaliação da expressão gênica é influenciada pela quantidade e qualidade do RNA inicial. A pureza e integridade do RNA são elementos críticos para se obter análises de boa qualidade. Começar com um material de baixa qualidade pode comprometer os resultados das aplicações subseqüentes, principalmente quando se trata de *microarrays*, uma metodologia altamente cara e trabalhosa.

Os primeiros passos para obtenção de um material de boa qualidade, envolvendo a aquisição, processamento e armazenamento do tecido de interesse, nesse caso, tecido cerebral, são críticos para se obter êxito no uso de metodologias que analisam expressão gênica (Bunney et al., 2003). Para isso, temos que contar com a qualidade e uso de bancos cerebrais. Os casos selecionados nesse trabalho foram provenientes do Banco de Encéfalos Humanos do Grupo de Estudos sobre Envelhecimento Cerebral (BEHGEEC) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Esse banco foi criado em 2003 com os seguintes objetivos: 1) realizar um grande número de autopsias de indivíduos idosos; os doadores chegam à autopsia através de um serviço de autopsia geral (Serviço de Verificação de Óbitos da Capital), seguidos por protocolos de dissecação específicos. Os casos coletados representam um grande número de sujeitos não dementados e um

vasto espectro de patologias relacionadas ao envelhecimento cerebral; e 2) fornecer material de alta qualidade a uma rede de pesquisa multidisciplinar permitindo a exploração de múltiplos aspectos dos processos de envelhecimento cerebral e doenças neurodegenerativas relacionadas (Grinberg et al., 2007). Devido esse potencial de coleta de um grande número de amostras foi possível selecionar casos, não só com a doença de Alzheimer e normais, mas também casos como outras demências e indivíduos que só possuíam a neuropatologia da DA sem comprometimento clínico, o que enriqueceu muito o trabalho. Toda a coleta, armazenamento do tecido, e avaliações neuropatológicas e clínica foram executados pelo BEHGEEC.

Com o material em mãos, o próximo passo foi a extração do RNA. A qualidade do RNA pode ser diferente entre os métodos de extração (Fleige e Pfaffl, 2006). O cuidado que se deve tomar é evitar a introdução de RNases durante o manuseio das amostras de RNA. Essas enzimas são as grandes vilãs para a degradação do RNA. Nós optamos por utilizar o RNeasy Mini Kit (QIAGEN) para a isolamento de RNA total, mostrando resultados satisfatórios, uma vez que foi possível recuperar o RNA total de todas as amostras selecionadas, não obtendo nenhum RNA totalmente degradado, ao contrário de outras metodologias aplicadas, como Trizol e Cloreto de Césio, em que não foi possível recuperar o RNA total de todas as amostras (dados não mostrados). Apesar do kit utilizado não ter proporcionado uma massa de RNA muito grande, a qualidade do ácido nucléico obtido foi boa, até os RNAs de qualidade moderada não foram descartados, uma vez que

submetidos a metodologia de amplificação de RNAm adequada podem ser utilizados para experimentos de *microarray* (Schoor et al., 2003).

A avaliação da qualidade do RNA pode ser feita por vários métodos: mensuração da razão das densidades ópticas de 260nm e 280nm; eletroforese do gel de agarose; ou pelo novo método que utiliza um chip onde as amostras são separadas eletroforeticamente em microcapilares, como realizado pelo *Bioanalyzer 2100* (Agilent Technologies) e pelo *Experion* (Bio-Rad Laboratories).

Uma razão 260nm/280nm maior que 1.8 é, geralmente, considerada um indicador aceitável de RNA de boa qualidade (Sambrook et al., 1989). Porém, a acurácia do método 260nm/280nm tem sido questionada, pois o valor de 1.8 corresponde a somente 40% de RNA, sendo o restante de proteínas. A razão 260/280 da maioria das amostras desse estudo foi ≥ 2 , o que é importante, pois uma razão igual a 2 já representa 100% de RNA.

Avaliar a integridade do RNA através do clássico gel de agarose é uma alternativa mais econômica, entretanto, a quantidade de RNA a ser utilizada é relativamente grande, principalmente, como no caso desse estudo, a massa obtida de RNA total foi pequena. Ademais, o gel de agarose permite uma avaliação baseada somente na visualização das bandas ribossomais 28S e 18S. Uma nova ferramenta para a avaliação da qualidade do RNA é o Número de Integridade do RNA (RIN, do inglês, *RNA Integrity Number*) gerado pelo *Bioanalyzer*. Essa ferramenta permite a classificação do RNA total em um sistema de numeração que varia de 1 a 10, com 1 sendo o perfil mais degradado e 10 sendo o mais intacto. No entanto, uma

avaliação baseada só no RIN, também não é aconselhável, pois, como ele é gerado através de um algoritmo e um software, está sujeito a falhas. O interessante, é que o *Bioanalyzer*, além de fornecer o RIN, também disponibiliza a imagem de um gel e um eletroferograma que mostra todo o perfil do RNA. Assim, são fornecidos subsídios suficientes para uma avaliação mais adequada da qualidade do RNA.

5.2 Contribuição do nosso estudo para o entendimento da DA

Estudos da DA que utilizam cDNA *microarrays* têm contribuído muito para o melhor entendimento da doença, revelando várias vias moleculares associadas à DA, como inflamação, apoptose, elementos sinápticos, fatores de transcrição, dano de DNA, estresse oxidativo, metabolismo de lipídeos, entre outros (Ginsberg et al., 2000; Loring et al., 2001; Pasinetti et al., 2001; Colangelo et al., 2002; Yao et al., 2003; Blalock et al., 2004; Emilsson et al., 2006; Brooks et al., 2007; Katsel et al., 2007; Counts et al., 2007). Entretanto, a maioria desses trabalhos compara indivíduos com DA a indivíduos normais (controles). Apenas um estudo foi executado com casos de DA e controles não dementados que exibiam neuropatologia da DA, sugerindo uma disfunção imune com aumento da imunidade mediada pelo complexo principal de histocompatibilidade, classe II (MHC-II) e diminuição no número células T nos casos com DA (Parachikova et al., 2007).

O presente estudo realizou análises de cDNA *microarray* utilizando 32 indivíduos – classificados de acordo suas características clínicas e neuropatológicas – buscando por diferenças entre essas características.

Foram realizadas duas análises estatísticas para buscar os genes diferencialmente expressos: a Análise de Variância (ANOVA) e o *Significance Analysis of Microarray* (SAM). A clusterização hierárquica dos valores de expressão dos genes diferencialmente expressos identificados pelo SAM (33 genes) foi um pouco mais específica do que a clusterização realizada com o genes da ANOVA (303 genes). Porém, nenhuma dessas clusterizações mostrou um padrão de expressão gênica muito bem definido. Levando isso em consideração, os dados obtidos pela ANOVA (303 genes) foram mais informativos do que os do SAM (33 genes). Portanto, as análises subsequentes foram baseadas nos genes obtidos pela ANOVA.

A busca por genes diferencialmente expressos no hipocampo e córtex frontal separadamente mostrou que os genes obtidos no hipocampo (177 genes) foram diferentes dos genes obtidos no córtex frontal (163 genes), havendo sobreposição de apenas 20 genes. Dessa forma, as análises seguiram considerando as amostras de cada região cerebral de forma independente. Além disso, o foco do trabalho não foi comparar duas regiões cerebrais, mas sim utilizá-las para obter um maior número de informação que ajudasse a diferenciar estados de uma mesma doença. Quanto a clusterização das amostras de córtex frontal não conseguir discriminar os grupos do estudo e a das amostras de hipocampo conseguir, uma possível explicação pode estar no padrão de distribuição das lesões da DA no

cérebro. De acordo com Braak e Braak (1991), as lesões da DA iniciam-se em regiões próximas ao hipocampo e progridem, nos estágios mais avançados, para o neocórtex. Portanto, quando as lesões chegam ao córtex frontal, a doença já está completamente estabelecida no hipocampo.

Os perfis de expressão gênica mais distintos foram encontrados entre os grupos dAD e OD (68 genes), seguidos de dAD e N (53 genes), enquanto que o mais próximo foi entre dAD e pAD (5 genes). A clusterização hierárquica, tanto dos 303 genes diferencialmente expressos pela ANOVA quanto dos 33 genes diferencialmente expressos obtidos pelo *SAM* entre os quatro grupos do estudo, mostrou que as amostras dAD foram agrupadas com pAD, e as amostras N agrupadas com OD, sugerindo que o padrão observado foi relacionado à presença ou ausência da neuropatologia da DA.

Em relação aos aspectos funcionais dos identificados como diferencialmente expressos, foram encontrados genes pertencentes a processos biológicos similares aos já descritos entre indivíduos com DA e normais. Além disso, foi mostrado, também, que esses mesmos processos biológicos estavam presentes entre pAD e N. Genes envolvidos no metabolismo do A β , metabolismo de lipídeos, apoptose, sinaptogênese, dano ao DNA, e ciclo celular estavam diferencialmente expressos tanto entre dAD e N quanto entre pAD e N. Na análise dos processos biológicos relevantes para esses mesmos grupos, organização celular e biogênese, transporte intracelular, ciclo celular, regulação do *folding* protéico, e metabolismo de macromoléculas apareceram hiper-representados.

A doença de Alzheimer é uma doença que pode levar 10 anos ou mais; ao invés de morrer imediatamente diante de insultos, neurônios podem tentar sobreviver iniciando uma progressão do ciclo celular, e tentar controlar o ciclo celular desregulado e a concorrente sinalização de morte celular (Herrup e Yang, 2007). Um ponto interessante para se notar é que, levando em consideração todas as combinações de grupos realizadas, ficou claro que toda vez que um grupo tem a patologia da DA, ciclo celular é relatado como um processo biológico relevante, implicando eventos de ciclo celular tanto em dAD quanto em pAD.

Tem sido postulado que neurônios de indivíduos com DA podem reentrar no ciclo celular, ir para a replicação de DNA e parar em G2, mantendo quase sua função normal e combatendo insultos, a menos que um outro insulto ("hit"), do qual a célula não seja capaz de vencer e manter o equilíbrio, aconteça, resultando em morte neuronal. Tal insulto poderia ser hipóxia/isquemia, ou estresse oxidativo (Yang e Herrup, 2007). Uma possível diferença entre dAD e pAD poderia ser que o estresse oxidativo fosse mais proeminente em dAD, explicando a morte neuronal e a apresentação clínica. Embora genes pertencentes ao processo biológico "dano de DNA" também estivessem diferencialmente expressos entre dAD e N, é interessante notar que esse processo biológico apareceu hiper-representado somente em pAD comparado a N. Não foi encontrado, porém, qualquer diferença na expressão de genes supressores tumorais entre dAD e N ou pAD e N, já que, uma vez tendo dano de DNA, proteínas supressoras tumorais seriam ativadas (Gärtner et al., 1999; Ogawa et al., 2003).

Quais genes estariam relacionados à patologia da DA foi a questão subsequente. Sete genes foram considerados como sendo apenas expressos quando a patologia da DA estava presente. Alguns destes genes, como MYC e GTF2H1, estão envolvidos no ciclo celular, com seus produtos gênicos funcionando como fatores de transcrição. UBE2L3, além de MYC e GTF2H1, interfere na ação da p53 (Di Lello et al., 2008; Ho et al., 2005; Moynihan et al., 1996). Recentemente, um estado conformacional da p53, que apresenta um comprometimento significativo de sua ligação ao DNA, tem sido apontado como um marcador periférico da DA (Lanni et al., 2008). Ademais, MINPP1 tem uma função que se sobrepõe à função do supressor tumoral PTEN (Gimm et al., 2001). Níveis de PTEN foram mostrados estar diminuídos na DA e a distribuição de PTEN difere significativamente em neurônios de cérebros com DA, comparados com neurônios de cérebros controles (Griffin et al., 2005). PTEN foi, também, relacionado à fosforilação da tau e sua capacidade de agregação (Zhang et al., 2006). Todos os sete genes foram associados às classificações de Braak e CERAD, reforçando a importância de alterações do ciclo celular na neuropatologia da DA. Como as associações foram encontradas com os estágios de Braak (avaliação de ENFs) e os escores do CERAD (avaliação PNs), não foi possível identificar qualquer diferença entre ENFs e PNs. Estes genes relacionados à patologia da DA podem apresentar importância clínica, podendo ser testada a validade desses genes em um set maior de amostras sanguíneas, como marcadores da neuropatologia da DA.

Por outro lado, seis genes foram associados aos sinais clínicos da DA e ao CDR, sendo quatro deles (ERMP1, KIRREL3, SYAP1 e ZXDC) diferencialmente expressos entre dAD e pAD. Estes genes ainda não foram relacionados à DA. Entretanto, o gene ZXDC codifica uma proteína *zinc finger*, que é uma importante reguladora da transcrição do MHC classe II (Al-Kandari *et al.*, 2007). Recentemente, foi demonstrado que a expressão do MHC classe II estava alterada, em um estudo comparando os mesmos grupos caracterizados aqui como dAD e pAD (Parachikova *et al.*, 2007).

Até aqui, ficou claro que o padrão geral de expressão gênica de pAD é muito similar ao de dAD. Apesar dessa similaridade, houve a tentativa de discriminar essas condições. Para isto, foram utilizados métodos de classe aplicados ao perfil de expressão gênica desses grupos para classificá-los. A classificação de doenças tem sido utilizada como uma ferramenta importante no diagnóstico molecular e classificação de diversas enfermidades, incluindo a DA (Nagasaka *et al.*, 2005; Ray *et al.*, 2007). Foram procurados trios (espaço tri-dimensional) de genes como classificadores, considerando todos os genes da plataforma de *microarray* (4.8K). Para um gene ser considerado parte de um classificador, ele não necessitava estar diferencialmente expresso entre os grupos utilizados para a classificação. Sendo assim, foram estabelecidos três classificadores.

Um classificador foi composto pelos genes SULF1, H2AFZ e LOC348262, os quais puderam classificar as amostras dos grupos dAD e N. Tanto H2AFZ e LOC348262 foram diferencialmente expressos entre dAD e N. Os proteoglicanos sulfato de heparan, como o SULF1, agem como co-

receptores de fatores de crescimento ligados a heparina e de citocinas e estão envolvidos na sinalização celular (Day et al., 2005). O gene H2AFZ codifica um membro da família da histona H2A. Em resposta a certos estresses celulares, como danos no DNA, células desencadeiam um evento de remodelação de H2AFZ dependente de p53 para ativar uma resposta transcricional de p21. A depleção dessa histona, em uma linhagem de células humanas, leva à ativação da p21 e ao envelhecimento prematuro (Gévry et al., 2007). Portanto, H2AFZ tem influência sobre a transcrição de p21, a qual exerce papel regulador do ciclo celular por inibir quinases dependentes de ciclina (CDKs).

Outro classificador foi obtido para pAD e N. AES, RAB11A e BF329787 foi o melhor trio de genes obtido para, corretamente, classificar as amostras pAD e N. A proteína codificada por AES pertence a família Groucho e possui atividade apoptótica em neurônios (Zhang et al., 2008). Trifosfatos de guanosina da família Rab são importantes reguladores do tráfego de membrana, com Rab11 exercendo um papel específico na reciclagem de membrana. A interação entre Rab11 e prodrutina promove formação de neuritos (Shirane e Nakayama, 2006). AES e RAB11A estavam diferencialmente expressos pAD comparados a N.

Adicionalmente, um classificador pôde distinguir dAD de pAD. SYAP1, RAE1 and YRDC foram os genes responsáveis por esta distinção. SYAP1 é uma proteína associada à sinapse, cuja função ainda não foi esclarecida. O gene SYAP1 parece ser muito relevante para a classificação clínica, pois além de estar no classificador, ele foi um dos genes associados

aos sinais clínicos da DA e ao CDR nas amostras utilizadas nesse estudo. YRDC é um novo cDNA que codifica uma proteína humana putativa com domínio yrdC (Chen et al., 2003). RAE1 parece estar envolvido na regulação do complexo promotor da anáfase (APC) na mitose (Jeganathan et al., 2005). Nenhum gene envolvido nestes classificadores já foi relacionado à doença de Alzheimer.

Como o classificador de dAD e pAD é composto por dois genes novos com funções quase desconhecidas e um gene relacionado à regulação mitótica do APC, é tentativo explorar esse fato.

A progressão do ciclo celular é dependente da degradação cronologicamente controlada de proteínas reguladoras do ciclo celular pelo sistema ubiquitina-proteassomo. A progressão ordenada da mitose é regulada pelo APC, um complexo multiproteico que promove a ubiquitinação de seus alvos (reguladores mitóticos chaves) para destruição no proteassomo. Um alvo do APC é a securina, uma inibidora da anáfase. Para prevenir a degradação pré-matura da securina, fatores de transporte nucleares, como Rae1, associam-se aos complexos APC-securina. No final da metáfase, quando os cinetócoros estão ligados aos microtúbulos do fuso e o ponto de checagem está feito, Rae1 é liberado destes complexos, permitindo, então, a ubiquitinação da securina pelo APC. Assim, defeitos na inibição da atividade de APC podem resultar em uma segregação cromossômica anormal. Quantidades insuficientes de Rae1, um inibidor do APC, têm sido implicadas com um aumento na incidência na separação prematura das cromátides irmãs devido a uma destruição precoce da

securina (Jeganathan et al., 2005). Além disso, Rae1 se liga a microtúbulos e níveis diminuídos de Rae1 resulta em anormalidades do fuso mitótico (Wong et al., 2006). Portanto, RAE1 tem um importante papel na regulação do ciclo celular mitótico, consequentemente, na progressão do ciclo celular.

6 CONCLUSÕES

1. Baseado no valor de expressão de 4608 genes, o perfil de expressão gênica de indivíduos com a doença de Alzheimer tanto clínica quanto patológica (dAD) e indivíduos clinicamente normais somente com a patologia da DA (pAD) é muito semelhante, mostrando ser estados similares de uma doença onde as principais vias moleculares relacionadas a patologia da DA já foram alteradas.
2. Foram identificados genes relacionados à neuropatologia e à clínica da DA, sendo que, se estes genes forem validados em um número maior de amostras sanguíneas, poderão servir como possíveis marcadores da neuropatologia e da clínica da DA.
3. Apesar dessa similaridade entre dAD e pAD, foram encontrados genes (classificadores) capazes de discriminar indivíduos dAD de N, pAD de N, e dAD de pAD. A classificação entre dAD e pAD indica que uma importante diferença entre essas duas condições pode estar na progressão do ciclo celular.

7 ANEXOS

Anexo A - Genes identificados pela ANOVA 2x2 das amostras de hipocampo e córtex frontal, seguidos pelo teste de Tuckey

ORESTES	Seq_acc	Símbolo do gene	pAD x N		OD x N		dAD x N		OD x pAD		dAD x pAD		dAD x OD	
			P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F
MR1-NT0179-071100-003-b11	BF920151	AASS	0,984	1,0	0,224	-1,2	0,556	1,1	0,200	-1,2	0,875	1,1	0,010	1,4
MR2-UM0060-300300-102-d08	AW800127	ABCF3	0,930	-1,1	0,263	1,2	0,491	-1,2	0,145	1,3	0,933	-1,1	0,010	-1,4
MR2-CN0035-220300-204-e05	AW842619	ABHD3	0,632	1,3	0,796	1,2	0,004	2,0	0,975	-1,1	0,267	1,5	0,047	1,7
MR3-NN0218-031100-004-g02	BF949651	ACLY	0,326	-1,2	0,570	-1,1	0,006	-1,3	0,926	1,1	0,648	-1,1	0,160	-1,2
QV0-DT0047-170200-123-g09	AW938004	ACP5	0,015	-1,2	0,946	-1,0	0,118	-1,1	0,051	1,2	0,639	1,1	0,327	-1,1
RC0-ET0078-070600-021-c12	BE829973	ACP6	0,016	-1,4	0,093	-1,3	0,070	-1,3	0,713	1,1	0,775	1,1	0,999	-1,0
QV4-UM0094-160300-136-e11	AW804706	ACSL5	0,075	1,8	0,996	1,0	0,039	1,7	0,114	-1,7	0,999	-1,0	0,067	1,6
CM0-BN0103-160300-291-d02	BE004154	ACTN1	0,034	-1,5	0,993	-1,0	0,064	-1,4	0,059	1,4	0,915	1,1	0,115	-1,3
PM3-FN0213-041200-002-d11	BF856289	ADAM15	0,039	-1,5	0,986	-1,0	0,375	-1,2	0,079	1,4	0,522	1,2	0,582	-1,2
MR2-NN1111-070800-008-c11	BE703422	AES	0,010	1,3	0,577	1,1	0,858	1,1	0,148	-1,2	0,060	-1,3	0,961	-1,0
MR2-NT0138-301100-004-h05	BF923962	AFF3	0,430	-1,4	0,998	-1,0	0,012	-1,8	0,514	1,3	0,647	-1,3	0,019	-1,7
IL3-HT0060-200899-009-B06	AW177993	AHSA1	0,026	1,4	0,722	-1,1	0,134	1,3	0,002	-1,6	0,728	-1,1	0,010	1,4
RC0-GN0090-150900-021-a06	BF369419	AMD1	0,129	1,5	0,954	-1,1	0,041	1,5	0,048	-1,6	1,000	1,0	0,010	1,6
CM1-TN0141-140900-407-g12	BF093494	ANKRD25	0,712	1,3	0,689	1,2	0,015	1,7	0,999	-1,0	0,408	1,4	0,198	1,4
CM3-LT0079-170200-092-e12	AW840384	ANKRD28	0,102	1,3	0,991	-1,0	0,019	1,3	0,057	-1,3	0,997	1,0	0,008	1,3
CM0-MT0033-150600-428-d11	BE830965	AOF1	0,935	1,0	0,718	-1,1	0,362	1,1	0,455	-1,1	0,854	1,1	0,043	1,2
QV3-HT0263-291299-050-e05	AW380203	APOBEC3G	0,039	-1,2	0,696	-1,1	0,405	-1,1	0,276	1,1	0,496	1,1	0,964	-1,0
PM3-BT0729-230400-002-f11	BE091429	ARCN1	0,734	1,2	1,000	1,0	0,040	1,5	0,758	-1,2	0,580	1,3	0,046	1,5
QV0-FN0066-120600-262-e12	BE836531	ARL2BP	0,915	-1,1	0,952	1,0	0,129	-1,2	0,694	1,1	0,611	-1,1	0,038	-1,3
PM2-MT0044-010700-001-e07	BE831258	ARPC3	0,032	1,5	0,856	-1,1	0,014	1,5	0,005	-1,6	0,998	-1,0	0,001	1,6
CM0-UM0001-010300-258-f04	AW792883	ASAH1	0,837	1,2	0,986	-1,1	0,032	1,6	0,677	-1,3	0,417	1,4	0,013	1,7
RC2-CS0017-250900-016-d10	BQ322366	ASCC1	0,559	1,2	1,000	1,0	0,027	1,4	0,610	-1,2	0,672	1,2	0,034	1,4
RC0-LT0070-070100-011-h07	AW581414	ATP10D	0,719	1,1	0,990	-1,0	0,096	1,2	0,557	-1,1	0,783	1,1	0,047	1,3
MR2-HT0757-270600-013-h11	Nd	ATP6V0B	0,034	-1,4	0,327	-1,2	0,036	-1,3	0,536	1,2	0,969	1,1	0,714	-1,1
CM1-HT0552-210200-124-a09	BE171753	ATPIF1	0,098	-1,4	0,908	1,1	0,305	-1,2	0,025	1,5	0,821	1,1	0,083	-1,4
QV3-CT0558-311000-452-f07	BF756552	AXIN2	0,132	1,2	0,041	1,2	0,142	1,2	1,000	1,0	0,982	-1,0	0,947	-1,0
MR1-CI0181-061100-001-h09	BF805287	B3GNT3	0,033	1,3	0,490	1,1	0,700	1,1	0,381	-1,1	0,241	-1,2	0,986	-1,0
CM1-NN1003-200300-153-h10	AW900010	BACE1	0,345	1,2	1,000	-1,0	0,047	1,3	0,334	-1,2	0,938	1,1	0,044	1,3
RC0-CT0205-270999-011-b09	AW376173	BACH1	0,816	1,2	0,861	-1,1	0,204	1,4	0,420	-1,3	0,853	1,2	0,036	1,6
RC3-CI0043-061100-014-a12	BF805451	BAMBI	0,996	1,0	0,774	1,1	0,030	1,4	0,937	1,1	0,141	1,3	0,243	1,2
QV3-BT0537-280100-070-g01	AW602168	BCL2	0,948	1,1	0,996	-1,0	0,081	1,3	0,887	-1,1	0,434	1,2	0,049	1,4
PM2-GN0014-050900-001-b09	BF084957	BTBD3	0,013	-1,2	0,557	-1,1	0,270	-1,1	0,188	1,1	0,387	1,1	0,955	-1,0
RC2-UT0087-130900-011-h05	BF096005	C13orf23	0,518	1,1	0,384	1,1	0,007	1,3	1,000	-1,0	0,468	1,1	0,306	1,1
PM3-LT0032-301299-005-f04	AW385802	C16orf53	0,111	-1,3	0,681	1,1	0,951	1,1	0,010	1,4	0,039	1,4	0,937	-1,1
RC0-BT0813-140900-021-g07	BF082832	C16orf63	0,014	1,6	0,726	-1,1	0,107	1,3	0,001	-1,8	0,650	-1,2	0,007	1,5
RC0-HT0841-150800-021-g04	BE719302	C1orf165	0,519	-1,3	0,984	1,1	0,007	-1,6	0,343	1,3	0,465	-1,3	0,002	-1,7
MR3-EN0090-201200-016-e05	BF853420	C1orf166	0,329	-1,2	0,647	1,1	0,896	-1,1	0,044	1,3	0,683	1,1	0,250	-1,2
QV4-FT0004-220700-309-a08	BF371959	C20orf23	1,000	-1,0	0,997	1,0	0,011	-1,2	0,997	1,0	0,044	-1,2	0,006	-1,2
QV4-BN0090-210300-144-c09	BE002688	C4orf16	0,708	-1,1	0,008	-1,3	0,750	-1,1	0,320	-1,2	0,996	1,0	0,107	1,2
QV2-OT0062-140400-137-e09	AW882943	C6orf64	0,031	-1,4	0,524	-1,2	0,522	-1,2	0,344	1,2	0,346	1,2	1,000	-1,0
MR2-ST0129-061099-009-e12	BF374773	C8orf13	0,027	1,2	0,960	1,0	0,222	1,1	0,076	-1,2	0,605	-1,1	0,475	1,1
PM0-CT0153-010999-001-e07	AW752098	C9orf125	0,042	1,8	0,940	1,1	0,028	1,7	0,126	-1,6	0,991	-1,1	0,110	1,5
QV2-BN0030-080300-073-f10	AW992818	CALR	0,186	-1,4	0,690	1,2	0,983	-1,0	0,022	1,6	0,318	1,3	0,463	-1,2
CM0-UT0003-050800-503-d02	BE698074	CAPN2	0,268	1,3	0,809	1,1	0,028	1,4	0,703	-1,2	0,932	1,1	0,204	1,2
CM0-CI0095-301000-648-e07	BF802140	CDC16	0,587	1,2	0,916	-1,1	0,008	1,5	0,277	-1,3	0,423	1,3	0,001	1,7

ORESTES	Seq_acc	Símbolo do gene	pAD x N		OD x N		dAD x N		OD x pAD		dAD x pAD		dAD x OD	
			P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F
RC3-BT0608-060200-012-e03	BE077498	CDV3	0,133	1,4	0,909	-1,1	0,038	1,4	0,036	-1,5	0,999	1,0	0,006	1,5
RC0-CN0028-010200-012-f10	AW603531	CEBPG	0,166	1,4	0,968	-1,1	0,077	1,4	0,073	-1,5	1,000	-1,0	0,025	1,5
PM0-BT0757-120400-001-E07	BE093807	CELSR1	0,163	1,4	0,993	1,0	0,019	1,5	0,246	-1,3	0,970	1,1	0,038	1,4
PM2-NN0222-161100-001-h08	BF955135	CENTG3	0,097	-1,3	0,921	-1,1	0,015	-1,3	0,273	1,2	0,993	-1,0	0,073	-1,2
MR1-TN0021-280800-001-b08	BE937635	CHFR	0,043	-1,3	0,998	1,0	0,069	-1,2	0,028	1,3	0,935	1,1	0,044	-1,2
MR0-HT0209-010500-111-a02	BE146386	CHST1	0,988	-1,0	0,810	-1,1	0,025	-1,2	0,973	-1,0	0,153	-1,2	0,192	-1,1
RC0-CT0318-201199-031-a06	AW363303	CNIH	0,032	1,4	0,977	-1,0	0,037	1,3	0,013	-1,4	0,963	-1,1	0,013	1,3
RC2-HT0252-261299-013-f12	AW379789	COG3	0,313	1,2	0,985	1,0	0,040	1,3	0,478	-1,2	0,941	1,1	0,092	1,2
PM0-EN0064-181000-001-f09	BF846187	COG6	0,231	1,2	0,454	-1,1	0,951	1,0	0,012	-1,4	0,461	-1,2	0,194	1,2
QV1-NN1104-170700-278-e12	BE703135	COL17A1	0,710	1,2	0,174	-1,3	0,703	1,1	0,032	-1,5	0,999	-1,0	0,013	1,5
QV4-BN0044-110200-108-h05	AW995807	CPSF3	0,030	1,2	1,000	1,0	0,116	1,2	0,036	-1,2	0,788	-1,1	0,142	1,2
MR2-NT0136-161100-004-g03	BF920912	CRKL	0,253	-1,2	0,597	1,1	0,056	-1,2	0,024	1,3	0,988	-1,0	0,002	-1,3
IL0-HT0205-131099-129-c07	AW369078	CRY2	0,724	-1,2	1,000	-1,0	0,015	-1,4	0,771	1,1	0,395	-1,2	0,019	-1,4
QV1-KT0023-131100-484-d04	BF736000	CRYZ	0,027	1,5	0,917	1,1	0,605	1,1	0,099	-1,4	0,264	-1,3	0,933	1,1
MR2-CI0128-011200-006-b09	BF815299	CSDE1	0,088	-1,2	0,380	1,1	0,995	-1,0	0,002	1,4	0,135	1,2	0,261	-1,1
RC2-HT0977-211100-017-c02	BF837504	CTSA	0,698	-1,2	0,747	1,1	0,364	-1,2	0,224	1,3	0,991	-1,0	0,050	-1,4
RC3-UT0035-100800-011-d08	BF379536	CXCL9	0,213	-1,5	0,039	-1,6	0,217	-1,4	0,985	-1,1	0,989	1,1	0,860	1,1
IL3-HT0618-160500-118-C04	BE709346	CXorf36	1,000	1,0	0,810	-1,1	0,253	1,3	0,837	-1,2	0,448	1,3	0,038	1,5
RC2-FN0164-080700-014-e10	BE839717	CYP24A1	0,609	1,2	0,712	-1,2	0,297	1,3	0,155	-1,5	0,993	1,0	0,031	1,5
MR0-BN0070-270500-026-c08	BE814299	DDX58	0,370	1,4	0,381	-1,3	0,096	1,4	0,021	-1,7	0,983	1,1	0,001	1,9
MR0-NT0039-160400-001-b08	AW890224	DEF6	0,008	-1,5	0,976	-1,0	0,040	-1,3	0,022	1,4	0,751	1,1	0,105	-1,3
QV4-NT0040-170400-174-g03	AW890450	DMN	0,230	1,4	0,840	1,1	0,003	1,7	0,618	-1,2	0,629	1,2	0,029	1,5
CM1-UT0038-150800-362-c02	BE698761	DNAJA2	0,546	-1,3	0,979	-1,1	0,028	-1,7	0,750	1,2	0,694	-1,3	0,074	-1,6
CM1-HT0876-031000-462-h04	BF831184	DNAJA4	0,995	-1,0	0,943	1,1	0,150	-1,3	0,892	1,1	0,397	-1,3	0,042	-1,4
PM0-KT0036-310101-002-h01	BQ300355	DNAJC5	0,283	-1,3	0,915	-1,1	0,016	-1,4	0,596	1,2	0,853	-1,1	0,082	-1,3
MR2-EN0091-191200-002-a11	BF853223	DPM2	0,013	-1,4	0,917	-1,1	0,196	-1,2	0,053	1,4	0,464	1,2	0,526	-1,1
QV4-HT0536-210300-145-g10	BE170205	DRG2	0,008	-1,4	0,437	-1,1	0,016	-1,3	0,185	1,2	0,893	1,1	0,400	-1,2
QV4-DT0021-281299-070-b04	AW364486	EDD1	0,206	1,3	0,893	1,1	0,022	1,4	0,515	-1,2	0,953	1,1	0,121	1,3
PM2-CN0030-230200-005-b03	AW842414	EDN3	0,093	1,3	0,255	-1,2	0,994	-1,0	0,001	-1,5	0,057	-1,3	0,381	1,2
CM1-AN0080-141100-548-d09	BF735820	EDNRB	0,791	-1,1	0,912	1,1	0,171	-1,2	0,454	1,2	0,839	-1,1	0,039	-1,3
PM2-BN0141-200300-001-a09	BE007343	EIF3S10	0,435	1,4	1,000	-1,0	0,047	1,6	0,428	-1,4	0,880	1,2	0,045	1,6
CM0-NT0189-181100-703-a04	BF921689	EML4	0,097	1,3	0,921	-1,1	0,018	1,3	0,027	-1,4	0,997	1,0	0,003	1,4
MR0-CT0451-211100-021-g07	BF758919	ENTPD6	0,206	-1,3	0,880	-1,1	0,001	-1,6	0,531	1,2	0,489	-1,2	0,009	-1,5
RC0-GN0090-150900-021-h02	BF086852	EPB41L2	0,124	1,5	1,000	-1,0	0,035	1,5	0,118	-1,5	1,000	1,0	0,033	1,5
CM3-CT0341-170200-093-c07	AW858463	EPSTI1	0,006	-1,2	0,003	-1,2	0,000	-1,3	0,990	1,0	0,898	-1,0	0,637	-1,1
PM3-UT0058-050900-003-f06	BF095128	ERGIC1	0,027	-1,2	0,942	-1,0	0,018	-1,2	0,085	1,2	0,988	1,0	0,075	-1,2
PM0-HT0018-170899-001-a03	AW177711	ETS2	0,289	1,7	1,000	1,0	0,015	2,1	0,301	-1,7	0,838	1,3	0,016	2,1
PM3-CT0240-290999-001-c06	AW360755	EXOSC1	0,475	1,3	0,936	-1,1	0,158	1,4	0,221	-1,4	0,986	1,1	0,042	1,5
QV0-TN0143-280800-367-c03	BF377948	EXOSC2	0,938	1,0	0,056	1,2	1,000	-1,0	0,377	1,1	0,925	-1,0	0,049	-1,2
QV2-OT0034-290600-246-g11	BE832888	EXTL3	0,918	-1,1	1,000	-1,0	0,012	-1,4	0,945	1,1	0,183	-1,3	0,016	-1,4
QV2-OT0034-250700-288-f04	BE832956	FAM125B	0,513	1,2	0,301	1,2	0,000	1,5	1,000	1,0	0,104	1,3	0,052	1,3
PM2-AN0093-011100-007-h09	BF734362	FAM50A	0,162	-1,3	0,719	1,1	0,234	-1,2	0,020	1,4	0,960	1,1	0,022	-1,3
MR3-HN0062-181200-004-a01	BF829157	FBXL10	0,038	-1,4	0,985	-1,0	0,047	-1,3	0,078	1,3	0,960	1,1	0,105	-1,2
QV2-NT0146-071100-468-e03	BF920328	FBXL15	0,351	-1,3	0,989	1,0	0,020	-1,5	0,226	1,3	0,817	-1,1	0,008	-1,5
QV0-UM0091-260500-245-h08	BE775308	FDPS	0,168	1,4	0,898	-1,1	0,864	1,1	0,046	-1,5	0,485	-1,2	0,459	1,2
CM1-NN1031-140400-170-h12	AW903596	FLJ31438	0,723	1,1	0,911	-1,1	0,126	1,2	0,383	-1,2	0,835	1,1	0,026	1,3
RC5-CS0027-051200-024-A05	BF766789	FLJ44968	0,023	-1,4	0,865	-1,1	0,147	-1,3	0,113	1,3	0,679	1,2	0,517	-1,2
CM1-ST0277-161299-070-e11	AW392973	FNTA	0,396	1,4	0,943	-1,1	0,161	1,5	0,179	-1,6	0,997	1,0	0,046	1,6
CM2-HT0508-110300-115-b08	BE167409	FOXE1	0,048	1,2	0,990	-1,0	0,276	1,1	0,025	-1,2	0,675	-1,1	0,158	1,1
QV0-BN0041-310300-180-f09	AW995236	GALNAC4S-6ST	0,182	-1,2	0,530	-1,1	0,000	-1,4	0,805	1,1	0,104	-1,2	0,002	-1,3
QV2-NN1195-071100-465-e08	BF951221	GALNS	0,995	1,0	0,831	1,1	0,020	1,2	0,966	1,0	0,114	1,2	0,151	1,2
QV1-ET0181-021200-522-b10	BF881103	GALNT14	0,006	1,3	0,674	1,1	0,373	1,1	0,079	-1,2	0,190	-1,2	0,959	1,0
MR1-UM0008-200300-004-a12	AW793670	GIMAP4	0,631	1,2	0,974	-1,1	0,052	1,5	0,412	-1,3	0,736	1,2	0,017	1,6

ORESTES	Seq_acc	Símbolo do gene	pAD x N		OD x N		dAD x N		OD x pAD		dAD x pAD		dAD x OD	
			P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F
QV0-EN0102-081100-458-c10	BF848739	GNLY	0,015	-2,2	0,091	-1,7	0,755	-1,2	0,700	1,3	0,119	1,8	0,508	1,3
CM3-GN0049-120800-297-b01	BE767811	GOLGA5	0,283	1,2	0,426	-1,2	0,084	1,3	0,015	-1,4	0,995	1,0	0,001	1,5
CM1-BT0019-231299-074-f10	AW369582	GTF2H1	0,026	1,4	1,000	1,0	0,009	1,4	0,030	-1,4	0,999	-1,0	0,012	1,4
MR1-TN0021-280800-001-d09	BE937637	GUK1	0,877	-1,1	0,956	1,1	0,071	-1,4	0,641	1,2	0,529	-1,3	0,020	-1,6
QV3-OT0065-280600-250-c09	BE833329	H2AFZ	0,066	1,4	0,936	1,1	0,001	1,5	0,189	-1,3	0,858	1,1	0,008	1,4
PM0-HT0346-251199-002-a08	AW383352	HAT1	0,998	-1,0	0,998	-1,0	0,020	1,6	1,000	1,0	0,042	1,6	0,013	1,6
QV4-BN0090-200400-178-d02	BE002935	HDHD1A	0,487	1,2	0,873	-1,1	0,128	1,3	0,175	-1,3	0,969	1,1	0,021	1,4
PM2-HT0190-081099-001-d06	AW368380	HERC3	0,915	-1,0	0,068	1,2	0,968	1,0	0,036	1,2	0,729	1,1	0,180	-1,1
PM0-OT0019-100500-004-a07	AW879488	HEXB	0,082	1,2	0,881	-1,1	0,071	1,2	0,017	-1,3	0,988	-1,0	0,010	1,3
MR0-CT0451-211100-021-b12	BF758911	HINT3	0,039	-1,2	0,337	-1,1	0,234	-1,1	0,560	1,1	0,676	1,1	0,996	-1,0
RC5-BT0708-220300-031-C03	BE089922	HPCAL4	0,169	-1,8	0,518	-1,4	0,008	-2,3	0,794	1,3	0,893	-1,2	0,227	-1,6
MR2-HT0756-030700-001-c02	BE715826	HS3ST1	0,194	-1,3	0,909	-1,1	0,002	-1,6	0,474	1,2	0,604	-1,2	0,012	-1,4
MR0-BT0551-060300-102-h03	BE073224	ICMT	0,120	1,3	0,567	-1,1	0,066	1,3	0,007	-1,5	0,999	-1,0	0,002	1,5
QV0-ET0001-100800-336-d08	BE827032	IFI16	1,000	1,0	0,874	-1,2	0,088	1,6	0,914	-1,2	0,194	1,6	0,013	1,8
QV1-ET0180-021200-524-h01	BF881076	IFNGR1	0,082	1,6	0,697	1,2	0,005	1,8	0,439	-1,3	0,950	1,1	0,085	1,5
MR3-NN1124-240700-008-c04	BE704267	INSR	0,999	1,0	0,981	1,0	0,014	1,4	0,998	1,0	0,070	1,3	0,039	1,3
QV2-OT0062-080500-203-h01	AW883691	IQCE	0,523	-1,1	0,845	-1,1	0,011	-1,3	0,906	1,1	0,544	-1,1	0,092	-1,2
MR4-NN0189-171100-202-a09	BF955410	IQSEC1	0,733	1,1	0,104	1,2	0,010	1,2	0,785	1,1	0,317	1,1	0,784	1,1
QV1-LT0035-070300-101-e07	BF357711	KIAA0020	0,297	1,3	0,660	-1,1	0,380	1,2	0,039	-1,4	0,976	-1,1	0,037	1,4
RC3-CI0043-111100-013-f01	BF807962	KIAA0286	0,403	1,3	0,441	-1,2	0,887	-1,1	0,030	-1,5	0,140	-1,4	0,862	1,1
CM3-FT0096-140700-243-f08	BE771837	KIAA0427	0,062	-1,5	0,974	-1,1	0,003	-1,6	0,137	1,4	0,955	-1,1	0,011	-1,5
RC2-BN0074-240300-015-e04	BE000876	KIAA1815	0,767	-1,1	0,999	1,0	0,204	1,3	0,695	1,2	0,049	1,5	0,265	1,2
QV4-NT0247-201100-563-a02	BF923058	KIF1A	0,721	-1,1	0,755	1,1	0,183	-1,2	0,245	1,2	0,904	-1,1	0,018	-1,3
RC0-AN0040-200700-032-c10	BQ291667	KIF20A	0,143	1,4	0,816	-1,1	0,459	1,2	0,025	-1,6	0,792	-1,2	0,098	1,4
MR0-HT0168-141199-002-a12	BE144451	KIRREL3	0,504	-1,1	0,897	1,0	0,446	1,1	0,203	1,1	0,047	1,2	0,855	1,0
MR3-GN0151-071100-005-a08	BF996596	KISS1	0,110	1,2	0,070	1,2	0,017	1,2	0,998	-1,0	0,992	1,0	0,947	1,0
CM1-ST0277-061299-059-g02	AW392923	KLF11	0,424	1,2	0,500	-1,2	0,971	1,1	0,041	-1,5	0,653	-1,2	0,262	1,3
MR2-BT0590-250200-105-f07	BE075707	KLF7	0,098	1,2	0,860	-1,0	0,894	1,0	0,019	-1,2	0,305	-1,1	0,447	1,1
QV1-HT0638-230500-207-c04	BF353345	KLK13	0,068	-1,1	0,348	1,1	0,841	-1,0	0,001	1,2	0,276	1,1	0,070	-1,1
MR1-HT0710-220500-002-a04	BE713379	KLK7	0,908	-1,3	1,000	1,0	0,040	-2,4	0,892	1,3	0,365	-1,8	0,035	-2,4
RC2-UT0023-140800-014-a07	BE698705	LAPTM4A	0,853	1,1	0,818	-1,1	0,042	1,3	0,419	-1,2	0,447	1,2	0,004	1,4
QV0-HT0368-090200-099-g07	BE156568	LMAN1	0,332	1,2	0,926	1,1	0,046	1,3	0,642	-1,1	0,943	1,1	0,178	1,2
RC0-ST0280-021299-031-c05	AW393085	LOC129607	0,997	1,0	0,014	-1,4	0,528	-1,2	0,031	-1,4	0,539	-1,2	0,300	1,2
MR0-BN0384-121200-201-a05	BF753140	LOC285628	0,055	1,3	0,039	1,3	0,696	1,1	0,992	-1,0	0,343	-1,2	0,356	-1,2
QV4-MT0067-270600-268-e02	BE831904	LOC348262	0,059	-1,3	0,975	-1,0	0,000	-1,5	0,129	1,3	0,618	-1,1	0,001	-1,5
MR1-HT1185-211200-003-d03	BF844647	LOC387720	0,799	1,1	0,774	-1,1	0,183	1,3	0,323	-1,3	0,846	1,1	0,020	1,4
PM0-NN0046-040400-001-h11	AW896256	LOC399947	0,320	-1,3	0,580	-1,2	0,009	-1,5	0,917	1,1	0,710	-1,2	0,190	-1,3
MR2-NN1111-070800-008-e07	BE703406	LRP1	0,999	1,0	0,234	1,3	0,740	-1,2	0,454	1,3	0,753	-1,2	0,024	-1,5
QV0-BN0042-050500-216-b11	AW995641	LRRC6	1,000	-1,0	0,946	1,0	0,112	-1,2	0,964	1,0	0,228	-1,2	0,030	-1,2
QV4-UM0094-060400-159-a08	AW804936	LYAR	0,392	1,2	0,992	1,0	0,039	1,3	0,536	-1,2	0,887	1,1	0,078	1,3
MR2-CN0037-100300-106-h10	AW843117	MANBA	0,214	1,3	0,779	1,1	0,017	1,4	0,653	-1,2	0,926	1,1	0,163	1,3
MR3-ST0220-120100-025-g04	AW582443	MAP1A	0,743	-1,2	0,841	1,1	0,244	-1,3	0,327	1,3	0,937	-1,1	0,042	-1,4
CM1-BN0111-240300-161-b08	BE004649	MAPRE1	0,185	1,4	0,877	1,1	0,015	1,5	0,499	-1,2	0,935	1,1	0,095	1,3
PM3-GN0510-230501-006-a08	BQ368557	MAST4	0,575	-1,2	0,687	1,2	0,173	-1,3	0,129	1,4	0,966	-1,1	0,012	-1,6
PM0-GN0018-130900-003-a02	BF085039	MBD2	0,227	1,3	0,768	1,1	0,024	1,4	0,684	-1,2	0,948	1,1	0,216	1,3
MR3-GN0186-171100-007-d08	BG003230	MINPP1	0,024	1,3	0,988	1,0	0,003	1,4	0,048	-1,3	0,998	1,0	0,007	1,3
RC3-CT0254-230300-028-f04	AW854050	MORC3	0,705	1,1	0,697	-1,1	0,188	1,2	0,200	-1,3	0,919	1,1	0,014	1,4
QV4-CT0491-180800-358-c11	BE928273	MPDZ	0,020	1,2	0,761	1,1	0,231	1,1	0,143	-1,2	0,517	-1,1	0,784	1,1
QV0-AN0014-300600-289-g02	BE811192	MRPL27	0,704	-1,1	0,516	1,1	0,039	-1,3	0,123	1,3	0,604	-1,2	0,001	-1,5
QV4-SN0024-200700-304-c01	BE841209	MTERF	0,221	1,2	0,397	-1,1	0,853	1,1	0,009	-1,3	0,588	-1,1	0,091	1,2
RC0-HT0374-131299-031-c12	AW384219	MYC	0,001	1,6	0,910	1,1	0,000	1,6	0,007	-1,5	0,990	-1,0	0,003	1,5
QV0-ST0294-070400-186-f11	AW820106	MYEOV	0,200	-1,3	0,759	1,1	0,890	-1,1	0,031	1,5	0,509	1,2	0,332	-1,2
RC2-BN0131-030400-011-a02	BE006629	MYO6	0,336	1,2	0,907	1,1	0,002	1,4	0,675	-1,1	0,459	1,2	0,016	1,3
CM0-FN0042-200500-388-e02	BE835884	NAG	0,849	-1,1	0,807	1,1	0,304	-1,2	0,403	1,2	0,907	-1,1	0,049	-1,4

ORESTES	Seq_acc	Símbolo do gene	pAD x N		OD x N		dAD x N		OD x pAD		dAD x pAD		dAD x OD	
			P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F
QV0-NN1141-021000-364-d07	BF942860	NDUFV3	0,995	-1,0	0,881	1,1	0,125	-1,2	0,819	1,1	0,363	-1,2	0,021	-1,3
MR2-ST0130-111099-003-b01	AW388700	NEK6	0,244	1,1	0,632	-1,1	0,935	-1,0	0,026	-1,2	0,091	-1,2	0,929	1,0
RC0-NT0031-260400-021-f12	AW889559	NET1	0,036	1,5	0,852	-1,1	0,970	1,1	0,005	-1,7	0,087	-1,4	0,598	1,2
QV2-NT0048-050900-348-e06	BF090580	NSUN2	0,438	1,1	0,841	-1,1	0,094	1,2	0,132	-1,2	0,960	1,0	0,012	1,2
CM1-NT0086-010600-239-h03	BE764901	NUP93	0,270	1,3	0,970	1,0	0,038	1,3	0,473	-1,2	0,960	1,1	0,109	1,3
RC2-BN0120-240300-011-g05	BE005613	NXT2	0,134	1,3	0,541	-1,1	0,123	1,3	0,008	-1,5	0,990	-1,0	0,004	1,4
RC2-BT0642-210200-013-d10	BE082769	NYD-SP18	0,558	-1,1	0,932	-1,1	0,044	-1,3	0,851	1,1	0,769	-1,1	0,165	-1,2
CM0-NT0131-281000-641-h02	BF919192	OIT3	0,114	1,2	0,702	-1,1	0,056	1,2	0,012	-1,3	1,000	-1,0	0,003	1,3
CM1-BN0020-170200-120-e08	AW992069	OPTN	0,051	-1,4	0,879	1,1	0,270	-1,2	0,010	1,5	0,700	1,2	0,059	-1,3
QV1-UT0094-201100-402-h05	BQ379637	OSBP	0,078	-1,2	0,395	-1,1	0,009	-1,2	0,682	1,1	0,989	-1,0	0,336	-1,1
QV1-FT0170-040700-265-c05	BF373541	OSBPL7	0,138	1,4	0,673	-1,1	0,245	1,3	0,013	-1,6	0,933	-1,1	0,019	1,5
QV1-FT0082-260600-253-b05	BE771395	PAM	0,149	1,3	0,823	-1,1	0,302	1,2	0,027	-1,5	0,911	-1,1	0,052	1,3
QV3-NT0022-230800-311-e06	BE936354	PARD3	0,034	1,4	0,818	1,1	0,026	1,4	0,179	-1,3	0,986	-1,0	0,189	1,2
QV4-CT0491-040800-344-g04	BE697944	PCMTD1	0,328	1,4	0,533	-1,2	0,313	1,3	0,029	-1,7	0,995	-1,0	0,015	1,6
RC0-CS0046-091100-023-d01	BF765614	PCTK1	0,415	-1,2	0,999	-1,0	0,033	-1,4	0,476	1,2	0,843	-1,1	0,045	-1,4
CM0-HT0245-031199-085-f11	AW379598	PEG10	0,999	-1,0	0,763	-1,1	0,308	1,2	0,895	-1,1	0,387	1,2	0,041	1,3
PM0-CI0046-181000-001-E07	BF800106	PHGDH	0,701	-1,2	0,262	1,3	0,605	1,2	0,050	1,5	0,155	1,4	0,929	-1,1
QV2-BT0616-051200-521-c03	BF747658	PIK3R4	0,437	1,3	0,988	1,0	0,049	1,4	0,606	-1,2	0,885	1,1	0,104	1,4
RC4-CN0050-140100-011-a11	AW604072	PLAUR	0,104	1,3	0,786	1,1	0,042	1,3	0,424	-1,2	1,000	-1,0	0,293	1,2
RC2-NT0112-120600-014-h08	BE767038	PLEKHC1	0,530	1,2	0,937	-1,1	0,100	1,3	0,261	-1,3	0,925	1,1	0,024	1,4
QV4-HT0536-210300-145-c06	BE170214	PLK3	0,059	-1,7	0,998	1,0	0,849	-1,2	0,042	1,8	0,243	1,5	0,765	-1,2
RC2-ST0301-240300-015-d10	AW821029	PLXND1	0,996	1,0	0,711	1,1	0,035	1,2	0,908	1,0	0,158	1,2	0,324	1,1
PM0-HT0346-251199-002-b07	AW383365	PNOC	0,932	-1,2	0,391	-1,5	0,025	-2,0	0,877	-1,2	0,256	-1,7	0,556	-1,4
CM0-CT0549-210900-565-f11	BQ318645	POLE2	0,054	1,6	0,961	-1,1	0,162	1,4	0,019	-1,7	0,840	-1,2	0,056	1,5
MR3-GN0187-171100-011-h04	BG003089	PPIL2	0,007	1,3	0,995	1,0	0,359	1,1	0,012	-1,3	0,201	-1,2	0,502	1,1
PM3-AN0085-290800-002-b12	BE925273	PPP2R1A	0,996	1,0	0,672	1,1	0,286	-1,2	0,884	1,1	0,311	-1,3	0,024	-1,4
QV0-BN0042-210800-346-c09	BE925839	PPP4R1	0,084	1,4	1,000	-1,0	0,004	1,5	0,074	-1,4	0,943	1,1	0,004	1,5
QV4-BN0090-270400-190-f10	BE003070	PRDM4	0,009	1,8	0,953	-1,1	0,252	1,3	0,002	-1,9	0,326	-1,4	0,090	1,4
QV4-GN0122-131000-467-g06	BF987914	PRKCE	0,160	-1,4	0,761	-1,2	0,001	-1,8	0,574	1,2	0,638	-1,2	0,024	-1,5
MR1-CI0021-161000-002-b06	BF799915	PSAT1	0,029	-1,5	0,634	1,1	0,944	1,1	0,002	1,7	0,008	1,6	0,921	-1,1
MR0-BN0115-210800-007-f07	BE926021	PTGFRN	0,993	-1,0	0,177	1,2	0,666	-1,1	0,194	1,2	0,899	-1,1	0,011	-1,2
QV4-BN0090-220700-307-a06	BF327496	PTPLB	0,364	1,6	0,425	1,4	0,006	2,2	0,986	-1,1	0,601	1,4	0,247	1,5
QV1-GN0207-131100-489-b09	BG001122	PTPN12	0,080	1,5	0,977	-1,1	0,003	1,7	0,035	-1,6	0,931	1,1	0,001	1,8
RC3-BT0502-120200-013-g06	BE070870	PTPRO	0,236	-1,7	0,972	-1,1	0,017	-2,0	0,422	1,5	0,905	-1,2	0,053	-1,8
CM1-GN0161-011100-536-a01	BF993632	RAB11A	0,026	1,3	0,996	1,0	0,204	1,2	0,042	-1,3	0,618	-1,1	0,299	1,2
MR1-KT0058-131200-003-c12	BF737827	RAB11FIP3	0,036	-1,3	0,565	-1,1	0,374	-1,1	0,346	1,2	0,502	1,1	0,989	-1,0
QV1-HT0313-280100-053-h07	AW606141	RABGGTA	0,992	-1,0	0,972	1,0	0,058	-1,2	0,914	1,1	0,240	-1,2	0,019	-1,3
QV4-OT0035-020300-124-b03	AW881364	RAE1	0,071	1,2	0,719	-1,1	0,538	1,1	0,007	-1,3	0,532	-1,1	0,088	1,2
MR2-NN1111-070800-008-f02	BQ338407	RASD1	0,037	1,2	0,276	1,1	0,813	1,1	0,608	-1,1	0,192	-1,1	0,788	-1,1
CM0-HT0530-060400-320-d06	BE170005	RBM10	0,985	-1,1	0,562	1,3	0,335	-1,4	0,469	1,4	0,703	-1,3	0,020	-1,7
CM1-HT0876-041100-456-d07	BF833830	RCBTB1	0,088	1,5	0,948	1,1	0,013	1,5	0,222	-1,4	0,993	1,0	0,054	1,4
RC0-UM0051-010300-011-e06	AW799163	RCOR1	0,179	1,4	1,000	-1,0	0,056	1,5	0,154	-1,5	0,999	1,0	0,045	1,5
QV1-ET0058-190600-243-c05	BE828856	RCP9	0,311	-1,2	1,000	-1,0	0,006	-1,3	0,332	1,2	0,657	-1,1	0,007	-1,3
QV2-NN0045-151200-555-g03	BF962405	RICS	0,580	-1,3	0,989	1,1	0,086	-1,6	0,417	1,4	0,872	-1,2	0,041	-1,7
RC0-CT0094-200899-002-E12	AW176766	RIF1	0,895	1,1	0,881	-1,1	0,197	1,2	0,548	-1,1	0,756	1,1	0,039	1,2
CM2-BN0023-050200-087-e05	AW992380	RP6-213H19.1	0,060	1,5	1,000	1,0	0,046	1,4	0,066	-1,5	0,990	-1,0	0,052	1,4
RC0-AN0040-200700-032-g01	BE812143	RPS12	0,033	1,4	0,249	1,2	0,256	1,2	0,612	-1,2	0,604	-1,2	1,000	-1,0
CM1-CI0032-201100-575-e05	BF811899	RTN4IP1	0,037	1,4	0,755	-1,1	0,169	1,2	0,003	-1,5	0,747	-1,1	0,016	1,3
QV4-NT0028-200400-179-a11	AW889289	SAMD4A	0,027	1,3	0,995	-1,0	0,562	1,1	0,016	-1,3	0,294	-1,2	0,420	1,1
MR2-EN0091-191200-002-b10	BF853215	SCNN1B	0,847	1,1	0,010	1,2	0,760	1,1	0,223	1,2	1,000	1,0	0,115	-1,2
QV3-OT0065-150600-231-h11	BE833293	SF1	0,008	-1,5	0,739	-1,1	0,250	-1,2	0,072	1,3	0,301	1,2	0,828	-1,1
RC4-OT0071-240400-014-g04	AW885738	SGK	0,324	1,6	0,933	1,1	0,030	1,9	0,620	-1,4	0,903	1,2	0,123	1,6
CM1-FN0107-180700-320-d10	BE838471	SH3PXD2A	0,684	-1,3	0,543	1,3	0,304	-1,4	0,124	1,6	0,982	-1,1	0,015	-1,8

ORESTES	Seq_acc	Símbolo do gene	pAD x N		OD x N		dAD x N		OD x pAD		dAD x pAD		dAD x OD	
			P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F
RC4-IT0014-291100-012-e05	BF771624	SIP1	0,062	1,2	0,602	-1,1	0,340	1,1	0,003	-1,3	0,674	-1,1	0,024	1,2
QV2-BT0273-311000-435-e10	BF744668	SLC12A4	0,453	-1,2	0,767	1,1	0,292	-1,2	0,108	1,3	1,000	-1,0	0,038	-1,3
MR4-TN0109-120900-201-d05	BF377286	SLC43A3	0,392	1,2	0,848	-1,1	0,009	1,4	0,115	-1,3	0,640	1,2	0,001	1,5
RC0-FN0204-221200-022-a10	BF856405	SMTN	0,612	-1,1	0,897	1,1	0,113	-1,2	0,274	1,2	0,896	-1,1	0,021	-1,2
PM0-UM0018-060700-004-b02	BE774514	SNX14	0,029	1,4	0,795	-1,1	0,129	1,2	0,003	-1,5	0,760	-1,1	0,014	1,3
IL3-HT0618-260700-225-B09	BF352651	SOCS4	0,534	1,3	0,990	-1,1	0,087	1,6	0,382	-1,4	0,904	1,2	0,042	1,7
MR4-NT0140-100401-213-b01	BQ345409	SPOCK2	0,352	-1,3	1,000	-1,0	0,020	-1,5	0,354	1,3	0,823	-1,1	0,021	-1,5
PM0-BN0139-050500-003-e07	BE007242	SRP9	0,010	2,0	0,965	1,1	0,003	1,9	0,028	-1,8	0,997	-1,0	0,013	1,7
IL3-CT0219-210100-058-E03	AW604183	ST6GAL1	0,235	1,3	0,703	-1,1	0,705	1,1	0,032	-1,4	0,751	-1,1	0,147	1,3
RC2-ET0021-280400-011-f03	AW946603	STK11	0,762	-1,1	0,110	1,2	1,000	1,0	0,025	1,3	0,760	1,1	0,111	-1,2
RC2-BN0126-170300-011-f10	BE006210	SYAP1	0,173	-1,2	0,958	1,0	0,773	1,1	0,070	1,3	0,027	1,3	0,968	1,0
MR2-HT1048-151200-001-b02	BF843129	SYMPK	0,027	1,4	1,000	-1,0	0,073	1,2	0,021	-1,4	0,858	-1,1	0,057	1,3
MR3-GN0186-171100-007-d07	BQ367148	TBRG1	0,294	1,2	1,000	-1,0	0,003	1,4	0,257	-1,2	0,576	1,1	0,002	1,4
PM3-DT0037-231299-001-f06	AW364677	TCEAL8	0,094	1,2	0,628	1,1	0,043	1,2	0,533	-1,1	1,000	-1,0	0,441	1,1
PM2-UM0053-240300-005-h12	AW799651	TCF19	0,083	1,3	0,932	-1,1	0,031	1,3	0,024	-1,4	1,000	-1,0	0,006	1,4
RC3-BT0661-310800-022-h02	BE926765	THAP8	0,751	-1,1	0,111	1,2	0,962	-1,0	0,024	1,3	0,936	1,1	0,035	-1,2
QV2-PT0012-030500-185-d01	AW875827	TIMM8A	0,552	1,1	0,825	-1,1	0,255	1,1	0,181	-1,2	0,994	1,0	0,041	1,2
MR3-ST0290-110100-201-b10	AW582658	TIMM9	0,291	1,3	0,943	1,1	0,021	1,4	0,561	-1,2	0,885	1,1	0,086	1,3
CM0-BN0106-170300-293-g07	BE004431	TMCO3	0,199	1,3	0,784	-1,1	0,228	1,2	0,034	-1,4	0,982	-1,0	0,029	1,4
RC2-BN0123-170300-011-g10	BE006093	TOX3	0,591	1,2	0,226	-1,3	0,418	1,2	0,027	-1,5	1,000	1,0	0,005	1,5
MR2-GN0123-231000-008-b08	BF989601	TREX1	0,025	1,3	0,445	1,1	0,960	1,0	0,358	-1,2	0,070	-1,3	0,749	-1,1
CM0-NN0001-100300-271-f03	AW892064	TTC13	0,963	1,1	0,422	-1,2	0,308	1,2	0,293	-1,3	0,751	1,1	0,009	1,4
QV0-HT0493-020300-136-a10	BE166415	TULP4	0,327	1,5	0,821	-1,2	0,082	1,6	0,080	-1,8	0,986	1,1	0,009	1,9
QV3-OT0064-060400-144-e08	AW884244	UBE2L3	0,039	-1,4	0,999	1,0	0,001	-1,5	0,030	1,4	0,945	-1,1	0,001	-1,5
MR2-CI0186-291100-008-h05	BF814397	UBE2O	0,145	-1,4	1,000	1,0	0,051	-1,4	0,130	1,4	1,000	-1,0	0,043	-1,4
CM0-BT0152-250899-043-f07	AW176106	UBLCP1	0,156	1,4	0,518	-1,2	0,644	1,2	0,009	-1,6	0,671	-1,2	0,062	1,4
RC3-NT0221-131200-011-b06	BF930903	USP20	0,194	-1,3	0,712	1,1	0,030	-1,3	0,025	1,4	0,979	-1,0	0,001	-1,5
QV1-BT0631-210800-337-d02	BE926620	UTP20	0,196	1,4	1,000	-1,0	0,022	1,5	0,170	-1,4	0,959	1,1	0,017	1,5
CM1-NT0270-271200-678-e08	BF935406	VAC14	0,008	-1,3	0,987	-1,0	0,328	-1,1	0,019	1,3	0,256	1,2	0,518	-1,1
QV1-CI0175-021100-452-h05	BF803592	VPS39	0,036	-1,3	0,789	-1,1	0,007	-1,3	0,204	1,2	1,000	-1,0	0,081	-1,2
RC2-ET0019-200600-017-f12	BF358810	WRNIP1	0,016	1,4	0,991	-1,0	0,091	1,2	0,008	-1,4	0,716	-1,1	0,046	1,3
PM3-NN1174-190501-031-e11	BQ343224	WSCD2	0,226	-2,3	0,878	-1,3	0,042	-2,7	0,566	1,7	0,984	-1,2	0,212	-2,0
MR3-GN0187-201100-010-f03	BG003841	ZBTB7B	0,420	1,1	0,041	1,2	0,109	1,1	0,872	1,0	0,977	1,0	0,975	-1,0
MR0-HT0167-141199-002-h03	BE144581	ZFYVE21	0,204	-1,5	0,367	-1,3	0,027	-1,6	0,930	1,1	0,970	-1,1	0,599	-1,2
CM3-FN0073-080600-206-b09	BE836738	ZMYM4	0,449	-1,1	0,429	-1,1	0,033	-1,2	0,997	1,0	0,812	-1,1	0,574	-1,1
MR3-EN0090-151200-011-h10	BF852859	ZMYND10	0,225	-1,3	1,000	1,0	0,015	-1,4	0,198	1,3	0,900	-1,1	0,012	-1,4
RC0-CN0028-090200-031-f11	AW842249	ZNF266	0,037	1,4	0,429	-1,2	0,224	1,2	0,001	-1,7	0,671	-1,2	0,005	1,4
PM0-NN1173-231000-001-c07	BF945265	ZNF34	0,955	-1,0	0,356	1,1	0,573	-1,1	0,233	1,2	0,939	-1,1	0,023	-1,3
MR3-GN0187-201100-008-e10	BG004044	ZNF526	0,622	1,1	0,478	1,1	0,014	1,3	1,000	1,0	0,483	1,1	0,339	1,1
MR0-HT0240-081199-001-b06	AW379158	ZNF559	0,091	1,4	0,992	-1,0	0,003	1,5	0,052	-1,4	0,888	1,1	0,001	1,5
RC1-GN0198-011200-013-e09	BG009053	ZNF84	0,186	1,2	0,907	-1,1	0,059	1,3	0,055	-1,3	0,999	1,0	0,010	1,3
PM0-HT0645-060400-001-c05	BE182286	ZXDC	0,112	-1,5	0,790	-1,1	0,974	1,1	0,440	1,3	0,049	1,5	0,532	1,2
RC4-GN0139-131100-021-d04	BQ367012	NA	0,096	1,2	0,984	-1,0	0,001	1,3	0,048	-1,3	0,788	1,1	0,000	1,4
RC5-HT0259-071199-031-a07	AW380009	NA	0,476	1,2	0,784	1,1	0,005	1,4	0,914	-1,1	0,459	1,2	0,067	1,3
PM1-HT0350-201299-004-a08	AW383513	NA	0,250	1,3	0,715	1,1	0,006	1,6	0,762	-1,2	0,729	1,2	0,091	1,4
PM3-HT0175-300999-001-g08	BQ356322	NA	0,317	1,5	0,665	1,3	0,007	2,0	0,869	-1,2	0,679	1,3	0,127	1,6
RC2-CS0018-250900-011-b04	BF229778	NA	0,023	1,3	0,506	1,1	0,010	1,3	0,297	-1,2	0,997	-1,0	0,260	1,2
QV0-ST0294-240300-173-a03	AW819990	NA	0,314	1,2	0,986	-1,0	0,013	1,4	0,189	-1,3	0,784	1,1	0,005	1,4
PM0-BT0649-250200-001-e03	BF332048	NA	0,265	1,3	0,180	1,3	0,013	1,5	1,000	-1,0	0,840	1,1	0,688	1,1
RC3-CN0018-020800-016-f03	BE825264	NA	0,241	1,3	0,997	-1,0	0,014	1,5	0,175	-1,4	0,875	1,1	0,008	1,6
QV0-ST0294-100400-185-h11	BQ364322	NA	0,043	-1,3	0,411	-1,1	0,015	-1,3	0,509	1,1	1,000	1,0	0,421	-1,1
RC0-FN0025-230500-031-b01	BF370163	NA	0,906	1,1	0,987	-1,0	0,016	1,4	0,772	-1,1	0,223	1,3	0,006	1,5
CM1-HN0016-161100-568-c06	BQ359202	NA	0,092	1,3	1,000	1,0	0,018	1,3	0,105	-1,3	0,998	1,0	0,022	1,3
CM1-BT0054-230300-159-e09	BF330587	NA	0,786	1,1	0,999	1,0	0,027	1,4	0,847	-1,1	0,439	1,2	0,038	1,4

ORESTES	Seq_acc	Símbolo do gene	pAD x N		OD x N		dAD x N		OD x pAD		dAD x pAD		dAD x OD	
			P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F
RC0-TN0079-310700-021-f04	BF376871	NA	0,034	1,4	0,762	1,1	0,029	1,4	0,209	-1,3	0,981	-1,1	0,246	1,2
RC2-BT0642-130300-017-f05	BQ302945	NA	0,232	1,2	0,960	-1,0	0,031	1,2	0,101	-1,2	0,963	1,0	0,008	1,3
CM0-TN0037-070900-532-f07	BF091485	NA	0,106	1,9	0,517	1,4	0,033	1,9	0,663	-1,4	1,000	1,0	0,485	1,4
CM1-CT0337-141299-068-g02	AW754308	NA	0,206	-1,2	0,281	-1,1	0,033	-1,2	0,968	1,0	0,979	-1,0	0,748	-1,1
QV3-SN0022-010600-218-e02	BE841175	NA	0,210	1,3	0,968	-1,1	0,039	1,4	0,097	-1,4	0,986	1,0	0,012	1,5
MR1-HT1064-271200-011-f12	BF845200	NA	0,563	1,2	0,768	1,1	0,041	1,5	0,962	-1,1	0,754	1,2	0,307	1,3
QV4-UM0094-160300-136-g07	BF378928	NA	0,463	1,1	0,888	1,1	0,043	1,2	0,826	-1,1	0,845	1,1	0,205	1,2
CM1-NN1006-200300-154-d12	AW900549	NA	0,075	1,5	0,996	1,0	0,045	1,4	0,114	-1,4	0,997	-1,0	0,077	1,4
RC2-TN0125-150800-012-g04	BE844225	NA	0,163	1,3	0,807	1,1	0,049	1,3	0,535	-1,2	0,999	1,0	0,303	1,2
PM0-BT0726-300300-001-G04	BE091205	NA	0,524	1,2	0,804	-1,1	0,055	1,4	0,156	-1,4	0,838	1,1	0,005	1,6
RC1-HT0939-160800-021-e12	BE934752	NA	0,997	1,1	0,774	-1,3	0,056	2,0	0,743	-1,4	0,203	1,9	0,004	2,5
CM1-FT0051-200600-281-a03	BE770023	NA	0,914	1,2	0,997	-1,0	0,059	1,7	0,845	-1,2	0,431	1,5	0,036	1,8
RC4-NT0117-030700-015-a10	BQ343806	NA	0,746	1,1	0,995	-1,0	0,062	1,2	0,626	-1,1	0,660	1,1	0,035	1,2
MR0-BN0115-161100-019-c12	BF752100	NA	0,387	-1,3	0,977	1,1	0,065	-1,4	0,221	1,3	0,948	-1,1	0,023	-1,4
CM3-MT0116-070900-326-c08	BF360225	NA	0,814	-1,1	0,719	1,1	0,065	-1,3	0,296	1,2	0,591	-1,2	0,004	-1,4
CM1-CT0605-141200-632-a02	BF759521	NA	0,618	1,1	0,908	-1,1	0,075	1,2	0,291	-1,2	0,819	1,1	0,014	1,3
QV1-FT0203-131100-468-d04	BF858110	NA	0,028	1,4	0,925	-1,1	0,118	1,3	0,007	-1,5	0,777	-1,1	0,027	1,3
RC4-NT0163-281100-011-c11	BQ344701	NA	0,863	1,1	0,441	-1,1	0,125	1,1	0,181	-1,1	0,684	1,1	0,002	1,2
MR4-TN0113-110900-102-f09	BF092772	NA	0,051	1,3	0,993	-1,0	0,125	1,2	0,028	-1,3	0,878	-1,1	0,068	1,2
RC0-NT0125-070600-021-c09	BF366936	NA	0,601	-1,1	0,868	1,0	0,132	1,1	0,241	1,1	0,015	1,3	0,478	1,1
RC2-HT0187-271099-011-a09	BQ347835	NA	0,699	1,1	0,723	-1,1	0,142	1,2	0,210	-1,2	0,876	1,1	0,011	1,3
MR4-ST0121-060200-002-e10	AW809603	NA	0,172	1,4	0,517	-1,2	0,153	1,3	0,010	-1,7	0,993	-1,0	0,005	1,6
RC5-CS0027-080101-026-C11	BQ323068	NA	0,965	-1,1	0,864	-1,2	0,167	1,6	0,998	-1,0	0,124	1,8	0,028	1,9
CM1-BT0742-020500-211-h11	BF332684	NA	0,026	1,9	0,513	1,3	0,170	1,5	0,318	-1,4	0,668	-1,3	0,897	1,1
MR4-TN0114-110900-101-e07	BF092878	NA	0,007	-1,5	0,319	-1,2	0,178	-1,2	0,232	1,3	0,368	1,2	0,987	-1,0
CM0-ET0122-311000-657-f04	BF871217	NA	0,981	-1,0	0,584	1,1	0,192	-1,1	0,472	1,1	0,549	-1,1	0,009	-1,2
PM3-AN0029-130700-001-a10	BE811766	NA	0,951	1,1	0,883	-1,1	0,201	1,3	0,659	-1,2	0,657	1,2	0,040	1,5
CM1-CI0132-081100-552-d02	BQ324295	NA	0,057	1,4	0,959	-1,1	0,211	1,3	0,020	-1,5	0,794	-1,1	0,075	1,3
QV4-HT0893-240800-373-b07	BE933663	NA	0,027	1,2	0,998	1,0	0,215	1,1	0,041	-1,2	0,612	-1,1	0,295	1,1
RC4-MT0235-061200-011-d12	BQ334714	NA	0,673	1,1	0,679	-1,1	0,228	1,2	0,173	-1,3	0,959	1,1	0,018	1,3
CM3-GN0053-080900-332-b05	BF086107	NA	0,374	1,2	0,836	-1,1	0,280	1,2	0,102	-1,3	1,000	-1,0	0,050	1,3
CM0-ET0122-311000-659-g09	BQ330558	NA	0,980	-1,0	0,594	1,1	0,310	-1,2	0,474	1,2	0,699	-1,1	0,020	-1,3
CM0-TN0032-070900-534-a06	BF091354	NA	0,537	-1,3	0,723	1,2	0,322	-1,4	0,126	1,6	1,000	-1,0	0,037	-1,6
RC3-FN0143-060700-021-f04	BF371455	NA	0,988	1,0	0,601	-1,2	0,325	1,2	0,520	-1,2	0,674	1,2	0,022	1,4
QV0-BT0263-250200-132-h07	BE062864	NA	0,254	1,2	0,678	1,1	0,374	-1,2	0,795	-1,1	0,010	-1,4	0,039	-1,3
RC2-UT0023-140800-014-b02	BE698701	NA	0,185	1,3	0,808	-1,1	0,470	1,2	0,034	-1,5	0,851	-1,1	0,098	1,3
RC0-BN0125-130300-021-c07	BE006138	NA	0,049	-1,4	0,996	-1,0	0,503	-1,2	0,076	1,4	0,466	1,2	0,640	-1,1
QV1-FT0203-021100-449-b12	BQ373299	NA	0,103	1,3	0,904	-1,1	0,558	1,1	0,026	-1,4	0,619	-1,2	0,201	1,2
RC2-BN0405-021000-011-b04	BQ312416	NA	0,030	-1,2	0,803	-1,1	0,696	-1,1	0,172	1,2	0,231	1,1	0,998	-1,0
QV0-FN0066-120600-022-e11	BE836530	NA	0,843	-1,1	0,217	1,2	0,823	-1,1	0,074	1,3	1,000	1,0	0,032	-1,3
PM0-OT0019-130600-005-A05	BF360604	NA	0,222	1,3	0,772	-1,1	0,871	1,1	0,038	-1,4	0,568	-1,2	0,321	1,2
QV0-CT0583-121000-427-d01	BF754533	NA	0,235	-1,1	0,810	1,1	0,917	-1,0	0,048	1,2	0,527	1,1	0,423	-1,1
CM0-NN1010-130300-281-d09	AW901143	NA	0,656	-1,1	0,214	1,1	0,932	-1,0	0,032	1,2	0,915	1,0	0,061	-1,1
QV0-HT0368-150200-113-h03	BE156625	NA	0,020	-1,8	0,945	-1,1	0,992	-1,0	0,065	1,6	0,038	1,7	0,993	1,0

303 genes identificados pela ANOVA estão listados em ordem alfabética pelos símbolos dos genes. Em cada combinação, os genes são considerados diferencialmente expressos com P valor < 0,05 (teste de Tukey). ORESTES, identificação da ORESTES. Seq_acc, número de acesso no *GeneBank*. P, p valor. F, fold. Nd, não determinado. NA, não anotado.

Anexo B - Genes identificados pela ANOVA 2x2 das amostras de córtex frontal, seguidos pelo teste de Tuckey

ORESTES	Seq_acc	Símbolo do gene	pAD x N		OD x N		dAD x N		OD x pAD		dAD x pAD		dAD x OD	
			P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F
MR1-NT0179-071100-003-b11	BF920151	AASS	0,999	1,0	0,066	-1,4	0,996	1,0	0,111	-1,4	1,000	1,0	0,041	1,5
MR2-UM0060-300300-102-d08	AW800127	ABCF3	0,192	-1,3	0,434	1,2	0,747	-1,1	0,012	1,6	0,627	1,2	0,076	-1,4
MR3-NN0218-031100-004-g02	BF949651	ACLY	0,514	-1,2	0,948	-1,1	0,041	-1,3	0,787	1,1	0,756	-1,1	0,128	-1,3
MR2-NN1111-070800-008-c11	BE703422	AES	0,049	1,3	0,576	1,1	0,384	1,2	0,368	-1,2	0,526	-1,2	0,987	1,0
IL3-HT0060-200899-009-B06	AW177993	AHSA1	0,136	1,3	0,857	-1,1	0,899	1,1	0,033	-1,4	0,363	-1,2	0,460	1,2
RC0-FN0204-221200-022-d08	BF856397	AKT1S1	0,574	1,2	0,522	1,2	0,042	1,4	0,999	-1,0	0,705	1,2	0,493	1,2
MR1-ET0144-101100-008-g09	BF874963	ANAPC5	0,183	1,2	0,726	-1,1	0,988	-1,0	0,029	-1,3	0,109	-1,2	0,889	1,1
PM0-OT0019-170200-001-c09	AW879318	ARAF	0,875	-1,2	0,745	-1,2	0,307	1,5	1,000	-1,0	0,135	1,8	0,045	1,8
MR2-CN0036-200300-101-b04	AW842696	ARHGEF16	0,984	1,0	0,025	1,2	0,926	1,0	0,146	1,2	0,998	1,0	0,096	-1,2
QV4-SN0024-210400-181-a05	AW866577	ARID1B	0,044	1,3	0,123	1,2	0,233	1,2	0,831	-1,1	0,665	-1,1	0,985	-1,0
QV0-FN0066-120600-262-e12	BE836531	ARL2BP	0,923	-1,1	0,937	1,1	0,139	-1,3	0,682	1,1	0,594	-1,2	0,041	-1,3
RC0-NT0118-110700-032-h12	BF366883	ATP10B	0,077	1,4	0,971	-1,0	0,530	1,2	0,034	-1,4	0,524	-1,2	0,291	1,2
QV1-NN0228-091100-436-d04	BF951810	ATP13A2	0,315	-1,6	0,618	1,3	0,356	-1,5	0,044	2,1	0,986	1,1	0,034	-1,9
MR1-AN0036-280800-003-c09	BE924927	ATPBD1B	0,049	-1,7	0,884	1,1	0,335	-1,3	0,012	1,9	0,578	1,3	0,091	-1,5
CM0-CI0139-311000-656-f12	BF802578	BCAR3	0,099	1,8	0,547	-1,3	0,988	1,1	0,007	-2,4	0,167	-1,7	0,363	1,4
PM2-TN0119-011200-006-b05	BF889111	C10orf6	0,147	-1,4	0,919	-1,1	0,656	1,2	0,361	1,3	0,018	1,6	0,295	1,2
QV4-FT0004-220700-309-a08	BF371959	C20orf23	0,537	1,1	0,927	1,1	0,298	-1,2	0,837	-1,1	0,037	-1,3	0,099	-1,2
QV1-CI0175-201100-500-e03	BF811913	C20orf42	0,406	1,2	0,686	1,1	0,041	1,3	0,918	-1,1	0,851	1,1	0,337	1,2
QV4-BT0407-020300-122-a08	BE070479	CAPN10	0,012	-1,3	0,907	-1,0	0,842	-1,1	0,046	1,2	0,062	1,2	0,999	-1,0
MR3-CI0184-011200-001-h03	BF815053	CASC4	0,868	1,2	1,000	1,0	0,044	1,7	0,899	-1,2	0,400	1,4	0,053	1,6
CM3-BT0595-170200-091-a10	BE076503	CCNF	0,648	1,3	0,999	1,0	0,228	-1,4	0,728	-1,2	0,040	-1,8	0,173	-1,5
QV4-UM0094-280300-152-e12	AW804912	CCNL2	0,803	-1,1	0,654	-1,1	0,332	1,2	1,000	-1,0	0,109	1,4	0,035	1,4
CM0-UT0003-160900-555-e04	BF093921	CEP152	0,017	1,3	0,292	1,1	0,261	1,1	0,361	-1,2	0,393	-1,1	1,000	1,0
RC0-EN0023-300500-031-g03	BE826039	CLIC4	0,645	1,4	0,801	-1,3	0,203	1,7	0,233	-1,8	0,950	1,2	0,032	2,2
RC0-CT0318-201199-031-a06	AW363303	CNIH	0,049	1,5	0,931	-1,1	0,296	1,2	0,015	-1,6	0,619	-1,2	0,101	1,3
PM0-EN0064-181000-001-f09	BF846187	COG6	0,129	1,3	0,905	-1,1	0,672	1,1	0,039	-1,4	0,562	-1,2	0,289	1,2
QV3-OT0063-270400-165-g07	AW884072	CPZ	0,023	1,4	0,739	1,1	0,488	1,1	0,148	-1,3	0,273	-1,2	0,975	1,0
PM2-TN0119-011200-006-f09	BF889142	CREBBP	1,000	-1,0	0,987	-1,0	0,040	1,2	0,996	-1,0	0,091	1,2	0,018	1,2
MR2-CI0128-011200-006-b09	BF815299	CSDE1	0,140	-1,3	0,822	1,1	0,924	1,1	0,030	1,4	0,047	1,4	0,995	-1,0
MR3-KT0051-030101-003-h05	BQ300058	CTNNA1	0,015	-1,6	0,887	-1,1	0,639	-1,1	0,060	1,4	0,133	1,4	0,966	-1,1
PM0-BN0144-240500-003-e05	BE815274	CX3CL1	0,014	1,4	0,049	1,3	0,426	1,1	0,774	-1,1	0,224	-1,2	0,634	-1,1
MR0-BN0070-270500-026-c08	BE814299	DDX58	0,875	1,2	0,482	-1,4	0,409	1,5	0,222	-1,8	0,938	1,2	0,026	2,1
QV0-BN0147-280400-213-d09	BE007945	DMTF1	0,945	1,1	0,032	1,3	0,605	1,1	0,244	1,2	0,959	1,1	0,354	-1,2
CM1-HT0876-031000-462-h04	BF831184	DNAJA4	0,964	-1,1	0,612	1,3	0,379	-1,4	0,442	1,4	0,804	-1,2	0,037	-1,7
IL3-CT0213-261199-035-H11	AW376471	DNAJB11	0,995	-1,1	0,146	-1,5	0,891	1,1	0,384	-1,4	0,831	1,2	0,033	1,7
MR2-EN0091-191200-002-a11	BF853223	DPM2	0,016	-1,8	0,954	-1,1	0,327	-1,3	0,044	1,7	0,313	1,4	0,625	-1,2
QV4-HT0536-210300-145-g10	BE170205	DRG2	0,003	-1,7	0,380	-1,2	0,022	-1,4	0,081	1,4	0,588	1,2	0,475	-1,2
PM2-CN0030-230200-005-b03	AW842414	EDN3	0,110	1,4	0,906	-1,1	0,847	1,1	0,032	-1,5	0,360	-1,2	0,457	1,2
CM1-AN0080-141100-548-d09	BF735820	EDNRB	0,636	-1,2	0,929	1,1	0,085	-1,3	0,340	1,2	0,802	-1,1	0,022	-1,4
CM0-NT0189-181100-703-a04	BF921689	EML4	0,052	1,5	0,971	1,1	0,031	1,5	0,113	-1,5	0,996	-1,0	0,082	1,4
MR0-CT0451-211100-021-g07	BF758919	ENTPD6	0,508	-1,3	0,966	1,1	0,109	-1,5	0,296	1,4	0,934	-1,1	0,041	-1,6
CM3-CT0341-170200-093-c07	AW858463	EPSTI1	0,356	-1,1	0,029	-1,2	0,001	-1,3	0,833	-1,1	0,243	-1,2	0,586	-1,1
QV2-OT0034-250700-288-f04	BE832956	FAM125B	0,653	1,1	0,470	1,1	0,002	1,4	1,000	1,0	0,131	1,2	0,067	1,2
QV4-HT0894-170800-362-g02	BE933705	FAM3B	0,262	-1,3	0,003	-1,6	0,471	-1,2	0,470	-1,2	0,920	1,1	0,084	1,4
QV2-NT0146-071100-468-e03	BF920328	FBXL15	0,474	-1,3	0,598	1,2	0,191	-1,4	0,078	1,7	0,992	-1,1	0,013	-1,8
CM1-CI0032-281100-607-b09	BF813743	FLJ11184	0,163	-1,2	0,256	-1,1	0,013	-1,2	0,945	1,0	0,914	-1,0	0,494	-1,1
QV0-CI0199-161100-506-b05	BF809579	FLJ20489	0,037	-1,6	0,738	-1,1	0,997	1,0	0,214	1,4	0,025	1,6	0,610	1,2
RC0-BN0129-270300-021-d02	BE006436	FRMD4B	0,937	1,1	0,901	-1,1	0,180	1,3	0,655	-1,2	0,639	1,2	0,045	1,5
QV0-BN0041-310300-180-f09	AW995236	GALNAC4S-6ST	0,977	-1,0	0,907	-1,1	0,008	-1,3	0,998	-1,0	0,073	-1,3	0,040	-1,3

ORESTES	Seq_acc	Símbolo do gene	pAD x N		OD x N		dAD x N		OD x pAD		dAD x pAD		dAD x OD	
			P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F
IL3-HT0618-150600-177-E04	BE709726	GEMIN5	0,150	1,7	0,795	-1,2	0,789	1,2	0,029	-2,1	0,505	-1,4	0,272	1,5
CM3-GN0049-120800-297-b01	BE767811	GOLGA5	0,329	1,4	0,453	-1,2	0,402	1,3	0,028	-1,7	0,980	-1,1	0,022	1,6
CM1-BT0596-060200-116-f06	BE076550	GSDMDC1	0,241	1,3	0,656	-1,1	0,985	-1,0	0,034	-1,4	0,143	-1,3	0,848	1,1
QV3-OT0065-280600-250-c09	BE833329	H2AFZ	0,171	1,5	0,973	1,1	0,049	1,6	0,314	-1,4	0,997	1,0	0,121	1,5
PM0-HT0346-251199-002-a08	AW383352	HAT1	1,000	1,0	0,834	-1,2	0,220	1,6	0,855	-1,2	0,403	1,5	0,041	1,9
CM3-ET0040-120500-181-d06	AW947315	HMGB2	0,989	1,0	0,769	-1,1	0,124	1,3	0,671	-1,2	0,386	1,2	0,015	1,4
RC2-DT0007-120200-018-g10	AW935533	HNF4A	0,053	1,4	0,865	1,1	0,039	1,3	0,195	-1,3	0,990	-1,0	0,189	1,2
RC1-BT0606-260400-014-g10	BE077373	HOXB6	0,431	1,2	0,023	1,3	0,251	1,2	0,712	1,1	1,000	1,0	0,645	-1,1
MR2-HT0756-030700-001-c02	BE715826	HS3ST1	0,518	-1,3	0,969	-1,1	0,043	-1,6	0,747	1,2	0,765	-1,2	0,112	-1,5
QV0-ET0001-100800-336-d08	BE827032	IFI16	0,930	-1,2	0,100	-1,7	0,336	1,4	0,495	-1,4	0,194	1,7	0,002	2,4
QV2-NN0045-051000-408-a09	BF943011	IL16	0,227	-1,2	0,765	1,1	0,968	-1,0	0,044	1,4	0,409	1,2	0,491	-1,1
QV4-HT0401-211299-064-g07	AW384620	IL17RA	0,038	1,3	0,803	1,1	0,427	1,1	0,182	-1,2	0,424	-1,1	0,919	1,0
MR3-NN1124-240700-008-c04	BE704267	INSR	1,000	1,0	0,845	-1,1	0,029	1,4	0,883	-1,1	0,086	1,4	0,004	1,5
MR4-NN0189-171100-202-a09	BF955410	IQSEC1	0,806	1,1	0,029	1,3	0,013	1,3	0,390	1,2	0,254	1,2	0,987	1,0
RC0-CN0026-300800-012-e12	BE926995	JMJD6	0,710	1,1	0,890	-1,1	0,174	1,2	0,356	-1,2	0,890	1,1	0,040	1,3
QV0-HT0368-310300-181-f07	BE156689	KBTBD10	0,935	1,1	0,998	-1,0	0,015	-1,3	0,882	-1,1	0,012	-1,4	0,022	-1,3
QV1-LT0035-070300-101-e07	BF357711	KIAA0020	0,560	1,3	0,301	-1,3	1,000	1,0	0,040	-1,7	0,607	-1,2	0,261	1,3
CM0-TN0038-100800-499-f04	BF376292	KIAA0319L	0,038	1,3	0,995	1,0	1,000	1,0	0,060	-1,3	0,041	-1,3	0,997	-1,0
CM3-FT0096-140700-243-f08	BE771837	KIAA0427	0,190	-1,5	0,880	1,1	0,184	-1,4	0,055	1,7	0,990	1,1	0,041	-1,6
QV0-NN1142-031100-483-e04	BF950121	KIF5A	0,389	1,6	0,049	2,0	0,279	1,6	0,896	1,2	1,000	-1,0	0,804	-1,3
MR2-BT0590-250200-105-f07	BE075707	KLF7	0,642	1,1	0,135	-1,2	0,871	-1,1	0,022	-1,3	0,283	-1,2	0,457	1,1
PM2-AN0089-051100-015-h08	BF734462	KRT7	0,224	1,3	0,956	-1,1	0,064	1,4	0,101	-1,4	0,995	1,0	0,020	1,5
RC4-BN0408-121100-012-b04	BF751971	LACTB2	0,413	1,3	0,485	-1,2	0,991	1,0	0,044	-1,5	0,561	-1,2	0,324	1,2
RC2-UT0023-140800-014-a07	BE698705	LAPTM4A	0,996	1,0	0,336	-1,2	0,414	1,2	0,356	-1,3	0,695	1,2	0,014	1,5
QV4-MT0067-270600-268-e02	BE831904	LOC348262	0,420	-1,3	0,960	1,1	0,103	-1,4	0,222	1,4	0,966	-1,1	0,036	-1,6
PM0-NN0046-040400-001-h11	AW896256	LOC399947	0,614	-1,3	0,984	1,1	0,099	-1,5	0,432	1,3	0,853	-1,2	0,046	-1,6
MR2-NN1111-070800-008-e07	BE703406	LRP1	0,372	-1,3	0,265	1,3	0,994	-1,0	0,016	1,8	0,491	1,3	0,172	-1,4
MR0-ET0109-211100-003-g09	BF878773	MAN2B1	0,121	-1,3	0,995	-1,0	0,697	1,1	0,179	1,3	0,016	1,4	0,546	1,1
CM1-NN0033-170400-194-h04	AW894944	MAP4K5	0,981	-1,1	0,211	-1,4	0,867	1,1	0,563	-1,3	0,732	1,2	0,045	1,6
RC2-DT0002-150200-015-h02	AW934825	MED10	0,991	1,0	0,474	-1,2	0,527	1,2	0,438	-1,2	0,820	1,1	0,040	1,4
MR3-GN0186-171100-007-d08	BG003230	MINPP1	0,029	1,5	0,955	1,1	0,072	1,3	0,075	-1,4	0,849	-1,1	0,195	1,3
PM3-HT0605-270200-001-a09	BE178577	MOAP1	0,038	1,4	0,909	1,1	0,932	1,1	0,125	-1,3	0,112	-1,3	1,000	-1,0
QV4-CT0491-180800-358-c11	BE928273	MPDZ	0,047	1,4	0,973	1,0	0,422	1,2	0,101	-1,3	0,481	-1,2	0,680	1,1
RC0-BT0387-170100-011-c10	BE069437	MUM1	0,850	-1,1	0,505	-1,2	0,510	1,2	0,981	-1,1	0,215	1,3	0,042	1,4
MR2-ST0130-111099-003-b01	AW388700	NEK6	0,078	1,2	0,827	-1,1	0,999	1,0	0,015	-1,3	0,103	-1,2	0,743	1,1
RC0-NT0031-260400-021-f12	AW889559	NET1	0,035	1,9	0,993	-1,1	0,843	1,2	0,020	-1,9	0,148	-1,6	0,695	1,2
QV2-OT0034-260700-285-d11	BE832979	NHN1	0,122	-1,5	0,782	1,1	0,999	1,0	0,022	1,7	0,097	1,5	0,850	-1,1
QV2-BT0636-291000-443-a10	BF744454	NR2F2	0,177	1,4	0,989	1,0	0,018	1,5	0,279	-1,3	0,937	1,1	0,038	1,5
RC2-BN0120-240300-011-g05	BE005613	NXT2	0,143	1,6	0,508	-1,3	0,900	1,1	0,010	-2,0	0,377	-1,4	0,180	1,4
CM0-NT0131-281000-641-h02	BF919192	OIT3	0,198	1,4	0,451	-1,2	0,454	1,2	0,013	-1,6	0,864	-1,1	0,028	1,5
QV1-UT0094-201100-402-h05	BQ379637	OSBP	0,042	-1,2	0,918	-1,0	0,030	-1,2	0,129	1,2	0,989	1,0	0,118	-1,2
QV1-FT0082-260600-253-b05	BE771395	PAM	0,112	1,6	0,476	-1,3	0,629	1,2	0,007	-2,0	0,554	-1,3	0,058	1,5
RC0-GN0134-261000-031-h06	BF990403	PIH1D1	0,949	-1,1	0,044	-1,3	0,279	-1,2	0,286	-1,2	0,743	-1,1	0,777	1,1
QV0-HT0398-210100-096-h01	AW606604	PLD2	0,588	1,1	0,198	-1,2	0,996	-1,0	0,027	-1,3	0,478	-1,1	0,283	1,1
QV0-CT0224-221199-057-f10	AW752983	PLP2	0,262	1,4	0,611	-1,2	0,735	1,2	0,033	-1,7	0,748	-1,2	0,132	1,4
CM0-CT0549-210900-565-f11	BQ318645	POLE2	0,024	1,7	0,814	-1,1	0,146	1,4	0,004	-1,9	0,643	-1,2	0,022	1,6
QV4-BT0536-221299-056-a07	AW373641	POMGNT1	1,000	-1,0	0,605	-1,2	0,438	1,2	0,735	-1,2	0,564	1,2	0,046	1,4
MR3-GN0187-171100-011-h04	BG003089	PPIL2	0,050	1,4	0,998	1,0	0,930	1,1	0,069	-1,4	0,142	-1,3	0,975	1,0
QV0-BN0042-210800-346-c09	BE925839	PPP4R1	0,159	1,6	1,000	1,0	0,048	1,6	0,172	-1,5	0,998	1,0	0,053	1,6
QV4-GN0122-131000-467-g06	BF987914	PRKCE	0,867	-1,2	0,898	1,1	0,055	-1,6	0,534	1,3	0,452	-1,4	0,011	-1,8
MR3-HT0446-300300-203-a12	BE161764	PRKCH	0,631	1,1	0,617	-1,1	0,441	1,1	0,138	-1,2	1,000	1,0	0,049	1,2
MR3-ST0191-140200-013-e11	AW813272	PRPF19	0,022	1,5	0,942	1,1	0,219	1,2	0,065	-1,4	0,505	-1,2	0,498	1,2
RC0-HT0934-300800-024-h09	BE934731	PRPF40A	0,385	1,3	0,857	-1,1	0,226	1,3	0,125	-1,4	1,000	1,0	0,047	1,4

ORESTES	Seq_acc	Símbolo do gene	pAD x N		OD x N		dAD x N		OD x pAD		dAD x pAD		dAD x OD	
			P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F
MR1-CI0021-161000-002-b06	BF799915	PSAT1	0,064	-1,6	1,000	1,0	0,959	1,1	0,063	1,6	0,025	1,7	0,962	1,1
QV4-BN0090-220700-307-a06	BF327496	PTPLB	0,236	2,1	0,272	1,8	0,045	2,5	0,982	-1,2	0,976	1,2	0,790	1,4
QV1-HT0313-280100-053-h07	AW606141	RABGGTA	0,994	-1,0	0,844	1,1	0,146	-1,3	0,777	1,1	0,391	-1,3	0,025	-1,4
PM0-HT0224-181099-001-g06	AW378576	RAP1B	0,997	1,0	0,415	-1,2	0,182	1,2	0,440	-1,2	0,414	1,2	0,006	1,4
RC1-HT0623-290300-011-d07	BE180468	RASA1	0,186	1,2	0,994	1,0	0,771	-1,1	0,267	-1,2	0,035	-1,4	0,624	-1,1
QV3-BN0096-200400-161-b08	BE003669	RB1CC1	0,914	1,1	0,636	1,1	0,424	-1,2	0,984	1,0	0,228	-1,3	0,049	-1,4
MR2-BT0590-250200-105-f12	BE075709	RBM15B	1,000	-1,0	0,145	-1,2	0,873	1,1	0,309	-1,2	0,879	1,1	0,029	1,3
RC1-HT0417-261299-011-b05	AW384806	RSAD1	0,467	1,4	0,398	-1,3	0,836	1,2	0,041	-1,8	0,870	-1,2	0,094	1,5
CM1-CI0032-201100-575-e05	BF811899	RTN4IP1	0,139	1,4	0,711	-1,1	0,767	1,1	0,020	-1,6	0,503	-1,2	0,198	1,3
PM3-HT0605-270200-001-a08	BE178597	RXRG	0,100	1,3	0,671	1,1	0,034	1,3	0,484	-1,1	1,000	1,0	0,312	1,2
MR2-EN0091-191200-002-b10	BF853215	SCNN1B	0,378	1,2	0,007	1,4	0,678	1,1	0,527	1,2	0,903	-1,1	0,094	-1,2
QV3-OT0065-150600-231-h11	BE833293	SF1	0,010	-1,7	0,794	-1,1	0,345	-1,2	0,062	1,5	0,221	1,4	0,866	-1,1
PM3-CT0263-141299-008-d09	AW361884	SFRS15	0,647	-1,2	0,036	-1,4	1,000	1,0	0,596	-1,2	0,616	1,2	0,031	1,4
RC4-IT0014-291100-012-e05	BF771624	SIP1	0,084	1,3	0,887	-1,1	0,731	1,1	0,021	-1,4	0,386	-1,2	0,314	1,2
QV4-GN0122-220900-415-a03	BF369840	SLC17A6	0,645	-1,1	0,250	1,1	0,987	1,0	0,044	1,3	0,473	1,1	0,412	-1,1
MR4-TN0109-120900-201-d05	BF377286	SLC43A3	0,506	1,2	0,977	-1,1	0,080	1,4	0,318	-1,3	0,891	1,1	0,033	1,5
MR2-HN0035-141200-015-f11	BF828706	SLIT3	0,292	-1,3	0,561	1,2	0,946	1,1	0,033	1,4	0,130	1,3	0,869	-1,1
PM0-UM0018-060700-004-b02	BE774514	SNX14	0,071	1,5	0,979	-1,1	0,856	1,1	0,034	-1,6	0,253	-1,4	0,639	1,2
MR3-ST0203-040100-022-e02	AW582146	SPRED2	0,952	-1,0	0,546	1,1	0,124	-1,2	0,363	1,2	0,504	-1,1	0,006	-1,3
RC0-AN0042-210700-021-a10	BF325946	STYX	0,999	1,0	0,548	-1,1	0,249	1,2	0,598	-1,1	0,460	1,1	0,015	1,3
MR2-HT1048-151200-001-b02	BF843129	SYMPK	0,045	1,4	0,999	1,0	0,814	1,1	0,060	-1,4	0,200	-1,3	0,887	1,1
RC2-UM0050-070400-018-g09	AW798874	TAF1C	0,030	-1,5	0,299	-1,2	0,966	-1,1	0,480	1,2	0,071	1,5	0,556	1,2
RC1-CT0251-290999-011-b10	nd	TGM3	0,055	1,5	0,961	-1,1	0,975	-1,1	0,022	-1,6	0,025	-1,5	1,000	1,0
QV2-PT0012-030500-185-d01	AW875827	TIMM8A	0,521	1,2	0,370	-1,2	0,910	1,1	0,045	-1,3	0,844	-1,1	0,120	1,2
QV2-NN0045-301100-507-e01	BF958613	TMEM10	0,958	1,1	0,872	1,1	0,049	1,4	0,999	1,0	0,287	1,3	0,219	1,2
RC0-EN0081-061200-032-f12	BF851926	TMEM108	0,193	1,2	0,842	-1,1	0,989	1,0	0,048	-1,3	0,301	-1,2	0,666	1,1
QV2-NN0045-201200-577-e05	BF963362	TMEM132B	0,205	1,3	0,962	1,1	0,817	-1,1	0,389	-1,2	0,047	-1,4	0,535	-1,2
MR1-NN0144-280700-003-a05	BQ338334	TMEM154	0,858	1,3	0,072	-2,0	0,981	-1,1	0,030	-2,5	0,687	-1,4	0,153	1,8
PM0-BT0275-211099-001-g01	AW370972	TMEM87A	0,503	-1,2	0,457	-1,2	0,483	1,2	0,999	1,0	0,062	1,4	0,032	1,3
QV0-TT0009-111199-055-f04	AW393875	TNFAIP3	0,995	-1,1	0,823	-1,2	0,255	1,5	0,960	-1,1	0,279	1,6	0,047	1,8
MR2-CI0186-291100-008-h05	BF814397	UBE2O	0,157	-1,6	0,901	1,1	0,496	-1,3	0,048	1,8	0,769	1,2	0,175	-1,5
CM3-CT0483-080900-335-a09	BF083905	UMPS	0,514	1,2	0,168	-1,3	0,954	1,1	0,017	-1,6	0,775	-1,2	0,060	1,4
RC3-NT0221-131200-011-b06	BF930903	USP20	0,275	-1,4	0,362	1,3	0,646	-1,2	0,015	1,7	0,831	1,2	0,039	-1,5
CM1-NT0270-271200-678-e08	BF935406	VAC14	0,023	-1,4	1,000	1,0	0,389	-1,2	0,020	1,4	0,341	1,2	0,342	-1,2
PM1-HT0340-091199-001-a12	AW382876	WDR79	0,695	-1,2	0,186	1,4	0,742	1,2	0,038	1,8	0,230	1,5	0,716	-1,2
QV3-HT0514-220300-127-b02	BE168362	WWC2	0,518	1,2	0,973	-1,0	0,363	-1,2	0,319	-1,2	0,044	-1,4	0,613	-1,1
RC0-BN0121-130300-021-g07	BE005898	XPNPEP1	0,026	1,4	0,550	1,1	0,800	1,1	0,251	-1,3	0,133	-1,3	0,974	-1,0
CM0-CS0041-301000-643-c07	BF763877	YRDC	0,748	-1,2	0,451	-1,2	0,014	-1,5	0,993	-1,0	0,308	-1,3	0,301	-1,3
QV0-HT0810-010800-323-h08	BF354992	ZIC5	0,981	-1,0	0,185	1,1	0,035	1,2	0,166	1,2	0,041	1,2	0,851	1,0
MR3-EN0090-151200-011-h10	BF852859	ZMYND10	0,217	-1,4	0,786	1,2	0,188	-1,4	0,045	1,6	0,995	1,0	0,027	-1,6
MR2-BT0590-100300-118-g04	BE076155	ZNF217	0,439	1,3	0,692	-1,2	0,263	1,3	0,091	-1,5	1,000	1,0	0,029	1,5
IL3-CT0213-191199-036-D11	AW752561	ZNF606	0,009	1,5	0,864	1,1	0,255	1,2	0,045	-1,4	0,277	-1,3	0,684	1,1
QV0-BT0263-250200-132-h07	BE062864	NA	0,154	1,4	0,433	1,2	0,870	-1,1	0,813	-1,1	0,041	-1,5	0,123	-1,3
CM1-CI0092-301000-503-f03	BF801994	NA	0,978	-1,0	0,337	1,1	0,710	-1,1	0,274	1,2	0,957	-1,0	0,045	-1,2
RC0-TN0079-110900-024-e02	BF376828	NA	0,260	1,2	0,028	1,3	0,656	1,1	0,915	1,1	0,806	-1,1	0,281	-1,2
CM0-ET0122-311000-657-f04	BF871217	NA	0,595	-1,1	0,474	1,1	0,471	-1,1	0,083	1,2	1,000	1,0	0,032	-1,2
CM1-CT0337-141299-068-g02	AW754308	NA	0,299	-1,2	0,628	-1,1	0,044	-1,3	0,867	1,1	0,941	-1,1	0,404	-1,1
MR1-NT0179-061100-001-h11	BQ344366	NA	0,995	1,0	0,040	1,2	0,928	1,0	0,160	1,2	0,992	1,0	0,142	-1,1
MR4-UM0021-270400-005-e12	BF378431	NA	0,040	1,5	0,771	1,1	0,591	1,2	0,205	-1,3	0,311	-1,3	0,990	1,0
QV4-HT0893-240800-373-b07	BE933663	NA	0,031	1,4	0,969	1,0	0,491	1,1	0,072	-1,3	0,325	-1,2	0,763	1,1
CM1-TN0134-210900-427-g04	BQ375395	NA	0,142	-1,5	0,998	-1,0	0,901	1,1	0,187	1,4	0,043	1,6	0,824	1,1
RC3-CT0413-270700-022-c12	BF335024	NA	0,287	1,3	0,486	-1,2	0,996	1,0	0,025	-1,5	0,377	-1,2	0,364	1,2
MR4-BT0598-030700-006-c05	BQ303846	NA	0,123	1,3	0,802	1,1	0,015	1,3	0,432	-1,2	0,968	1,1	0,110	1,2
CM1-CT0605-141200-632-a02	BF759521	NA	0,262	1,2	0,920	-1,1	0,058	1,3	0,098	-1,3	0,981	1,0	0,013	1,3

ORESTES	Seq_acc	Símbolo do gene	pAD x N		OD x N		dAD x N		OD x pAD		dAD x pAD		dAD x OD	
			<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>
RC4-GN0139-131100-021-d04	BQ367012	NA	0,597	1,2	0,830	-1,1	0,232	1,2	0,221	-1,3	0,979	1,1	0,043	1,4
QV4-HT0895-160800-350-e03	BE933758	NA	0,450	1,3	0,304	-1,3	0,904	1,1	0,027	-1,6	0,790	-1,2	0,089	1,4
RC5-HT0259-071199-031-a07	AW380009	NA	0,155	1,3	0,976	-1,0	0,010	1,5	0,078	-1,4	0,889	1,1	0,003	1,6
MR3-EN0089-121200-001-b03	BF852389	NA	0,226	1,5	0,707	-1,2	0,459	1,3	0,036	-1,8	0,894	-1,2	0,072	1,6
PM0-BN0167-210500-003-c05	BE815558	NA	0,724	1,5	0,035	-2,4	0,858	-1,3	0,008	-3,5	0,335	-1,8	0,178	1,9
CM1-FT0051-200600-281-a03	BE770023	NA	0,796	1,3	0,359	-1,5	0,229	1,6	0,116	-1,9	0,882	1,2	0,006	2,3
RC1-HT0939-160800-021-e12	BE934752	NA	0,998	-1,1	0,254	-2,0	0,279	1,9	0,490	-1,8	0,335	2,1	0,005	3,8

163 genes identificados pela ANOVA estão listados em ordem alfabética pelos símbolos dos genes. Em cada combinação, os genes são considerados diferencialmente expressos com *P* valor < 0,05 (teste de Tukey). ORESTES, identificação da ORESTES. Seq_acc, número de acesso no *GeneBank*. *P*, *p* valor. *F*, fold. Nd, não determinado. NA, não anotado.

Anexo 3. Genes identificados pela ANOVA 2x2 das amostras de hipocampo, seguidos pelo teste de Tuckey

ORESTES	Seq_acc	Símbolo de gene	pAD x N		OD x N		dAD x N		OD x pAD		dAD x pAD		dAD x OD	
			P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F
MR2-CN0035-220300-204-e05	AW842619	ABHD3	0,700	1,5	0,249	1,7	0,011	2,7	0,953	1,2	0,316	1,8	0,475	1,5
QV0-DT0047-170200-123-g09	AW938004	ACP5	0,011	-1,3	0,564	-1,1	0,002	-1,3	0,133	1,2	1,000	-1,0	0,047	-1,2
CM0-BN0103-160300-291-d02	BE004154	ACTN1	0,086	-1,5	0,960	-1,1	0,039	-1,5	0,190	1,4	1,000	1,0	0,112	-1,4
MR2-NT0138-301100-004-h05	BF923962	AFF3	0,507	-1,5	0,527	-1,4	0,013	-2,3	0,995	1,1	0,513	-1,5	0,234	-1,6
CM1-AN0080-021100-533-a11	BF735483	AGPAT4	0,780	1,1	0,665	-1,1	0,312	1,2	0,245	-1,2	0,948	1,1	0,033	1,3
IL3-HT0060-200899-009-B06	AW177993	AHSA1	0,180	1,5	0,868	-1,1	0,141	1,5	0,049	-1,7	0,997	-1,0	0,027	1,7
MR1-BN0213-100700-005-f04	BE816300	AKAP13	0,360	-1,6	0,563	1,3	0,998	-1,0	0,045	2,1	0,439	1,5	0,459	-1,4
MR3-GN0187-211100-009-c06	BG004607	ANKDD1A	0,024	-1,3	0,708	-1,1	0,550	-1,1	0,165	1,2	0,242	1,2	0,994	-1,0
CM3-LT0079-170200-092-e12	AW840384	ANKRD28	0,623	1,2	1,000	-1,0	0,038	1,4	0,618	-1,2	0,636	1,2	0,037	1,4
MR0-BN0070-030400-009-c10	AW999557	ANTXR1	0,994	-1,0	0,307	1,2	0,034	1,3	0,313	1,2	0,051	1,3	0,672	1,1
QV1-EN0042-300500-224-b01	BF358570	ARL1	0,300	-1,6	0,811	-1,2	0,026	-2,0	0,729	1,3	0,868	-1,2	0,166	-1,6
PM2-MT0044-010700-001-e07	BE831258	ARPC3	0,166	1,5	0,842	-1,1	0,026	1,6	0,040	-1,7	0,976	1,1	0,003	1,9
CM0-UM0001-010300-258-f04	AW792883	ASAH1	1,000	1,0	1,000	1,0	0,039	2,0	1,000	1,0	0,110	1,9	0,048	1,9
RC2-CS0017-250900-016-d10	BQ322366	ASCC1	0,589	1,3	0,555	1,2	0,022	1,7	0,999	-1,0	0,550	1,3	0,315	1,3
MR2-HT0757-270600-013-h11	nd	ATP6V0B	0,149	-1,3	0,135	-1,3	0,026	-1,4	0,991	1,0	0,984	-1,0	0,866	-1,1
CM1-HT0552-210200-124-a09	BE171753	ATPIF1	0,178	-1,5	0,516	1,2	0,435	-1,3	0,014	1,8	0,851	1,2	0,033	-1,6
QV3-CT0558-311000-452-f07	BF756552	AXIN2	0,150	1,3	0,045	1,3	0,011	1,4	0,999	1,0	0,906	1,1	0,927	1,1
RC3-CI0043-061100-014-a12	BF805451	BAMBI	0,869	-1,1	0,204	1,3	0,038	1,5	0,086	1,5	0,018	1,6	0,839	1,1
RC2-UT0087-130900-011-h05	BF096005	C13orf23	0,988	1,0	0,270	1,2	0,007	1,5	0,607	1,2	0,054	1,4	0,332	1,2
RC0-BT0813-140900-021-g07	BF082832	C16orf63	0,086	1,6	0,434	-1,3	0,372	1,3	0,004	-2,1	0,701	-1,2	0,018	1,7
RC0-HT0841-150800-021-g04	BE719302	C1orf165	0,688	-1,2	1,000	-1,0	0,010	-1,8	0,737	1,2	0,296	-1,4	0,012	-1,7
QV4-FT0004-220700-309-a08	BF371959	C20orf23	0,588	-1,1	0,993	-1,0	0,038	-1,3	0,723	1,1	0,667	-1,1	0,067	-1,3
RC0-ET0070-110700-022-c02	BF359220	C20orf7	0,282	-1,2	0,018	-1,2	0,060	-1,2	0,830	-1,1	0,977	-1,0	0,952	1,0
QV4-BN0090-210300-144-c09	BE002688	C4orf16	0,488	-1,2	0,041	-1,3	0,998	-1,0	0,781	-1,1	0,585	1,2	0,062	1,3
MR0-OT0082-230200-001-d09	AW886500	C4orf30	0,142	1,3	0,654	1,1	0,014	1,4	0,608	-1,2	0,948	1,1	0,176	1,3
CM0-CI0095-301000-648-e07	BF802140	CDC16	0,977	1,1	0,730	-1,2	0,017	1,7	0,582	-1,3	0,125	1,6	0,001	2,0
CM1-HB0002-131200-639-g10	BF741169	CDON	0,055	-1,3	0,033	-1,3	0,206	-1,2	0,996	1,0	0,758	1,1	0,805	1,1
RC3-BT0608-060200-012-e03	BE077498	CDV3	0,644	1,2	0,998	-1,0	0,026	1,6	0,553	-1,3	0,526	1,3	0,017	1,6
PM2-NN0222-161100-001-h08	BF955135	CENTG3	0,295	-1,3	0,447	-1,2	0,024	-1,5	0,952	1,1	0,860	-1,1	0,421	-1,2
QV1-NN1104-170700-278-e12	BE703135	COL17A1	0,953	1,1	0,127	-1,4	0,938	1,1	0,091	-1,6	1,000	-1,0	0,038	1,6
MR2-NT0136-161100-004-g03	BF920912	CRKL	0,759	-1,1	0,486	1,1	0,050	-1,3	0,148	1,3	0,556	-1,2	0,001	-1,5
RC2-HT0977-211100-017-c02	BF837504	CTSA	0,897	-1,2	0,789	1,2	0,271	-1,4	0,460	1,3	0,822	-1,2	0,044	-1,6
MR0-NT0039-160400-001-b08	AW890224	DEF6	0,037	-1,6	0,652	-1,2	0,024	-1,5	0,258	1,4	0,991	1,1	0,259	-1,3
QV2-NN0045-301100-507-g01	BF958558	DFNA5	0,281	-1,3	0,298	-1,2	0,016	-1,4	0,989	1,0	0,812	-1,1	0,498	-1,2
QV4-NT0040-170400-174-g03	AW890450	DMN	0,088	1,7	0,407	1,3	0,000	2,4	0,676	-1,3	0,320	1,4	0,010	1,8
MR2-CN0035-170300-201-f04	AW842540	E2F2	0,645	-1,3	0,977	-1,1	0,033	-1,8	0,837	1,2	0,577	-1,4	0,079	-1,7
CM0-NT0189-181100-703-a04	BF921689	EML4	0,915	1,1	0,462	-1,2	0,472	1,2	0,251	-1,3	0,935	1,1	0,031	1,4
MR0-CT0451-211100-021-g07	BF758919	ENTPD6	0,449	-1,3	0,391	-1,3	0,007	-1,8	0,999	1,0	0,439	-1,3	0,223	-1,4
CM3-CT0341-170200-093-c07	AW858463	EPSTI1	0,008	-1,3	0,056	-1,2	0,015	-1,2	0,603	1,1	0,866	1,1	0,943	-1,0
PM3-UT0058-050900-003-f06	BF095128	ERGIC1	0,202	-1,2	0,551	-1,1	0,030	-1,2	0,804	1,1	0,966	-1,0	0,384	-1,1
PM0-HT0018-170899-001-a03	AW177711	ETS2	0,191	2,4	0,973	1,2	0,009	3,5	0,343	-2,1	0,822	1,4	0,025	3,0
CM1-NN1008-170300-151-a08	AW900852	EXOC2	0,735	-1,1	0,566	-1,1	0,023	-1,4	1,000	-1,0	0,415	-1,2	0,314	-1,2
QV0-TN0143-280800-367-c03	BF377948	EXOSC2	0,832	1,1	0,096	1,2	0,944	-1,0	0,631	1,1	0,561	-1,1	0,029	-1,3
QV2-OT0034-290600-246-g11	BE832888	EXTL3	0,977	-1,1	0,751	-1,2	0,042	-1,6	0,971	-1,1	0,223	-1,5	0,288	-1,4
QV2-OT0034-250700-288-f04	BE832956	FAM125B	0,740	1,2	0,569	1,2	0,026	1,6	1,000	1,0	0,434	1,3	0,337	1,3
PM2-AN0093-011100-007-h09	BF734362	FAM50A	0,606	-1,2	0,848	1,1	0,133	-1,4	0,239	1,4	0,909	-1,1	0,023	-1,6
MR3-HN0062-181200-004-a01	BF829157	FBXL10	0,014	-1,6	0,996	-1,0	0,081	-1,3	0,021	1,5	0,650	1,2	0,124	-1,3
CM1-NN1031-140400-170-h12	AW903596	FLJ31438	0,758	1,1	0,937	1,1	0,028	1,4	0,960	-1,1	0,431	1,2	0,100	1,3
MR0-CT0451-040900-006-b03	BF083432	FXC1	0,493	-1,1	0,964	-1,0	0,290	1,1	0,735	1,1	0,030	1,3	0,126	1,2
RC0-HT0934-150800-021-b09	BE720824	FYTTD1	0,084	-1,4	0,835	1,1	0,710	-1,1	0,017	1,6	0,404	1,2	0,247	-1,3

ORESTES	Seq_acc	Símbolo de gene	pAD x N		OD x N		dAD x N		OD x pAD		dAD xpAD		dAD x OD	
			P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F
QV0-BN0041-310300-180-f09	AW995236	GALNAC4S-6ST	0,037	-1,3	0,480	-1,1	0,001	-1,4	0,376	1,2	0,794	-1,1	0,026	-1,3
MR1-UM0008-200300-004-a12	AW793670	GIMAP4	0,808	1,3	0,946	-1,1	0,141	1,6	0,535	-1,4	0,759	1,3	0,046	1,8
RC2-HT0560-190200-011-b02	BE173404	GLE1L	0,110	1,4	0,969	-1,1	0,035	1,4	0,049	-1,5	1,000	1,0	0,012	1,5
CM3-GN0049-120800-297-b01	BE767811	GOLGA5	0,804	1,1	0,884	-1,1	0,175	1,3	0,439	-1,2	0,815	1,1	0,039	1,4
CM1-NT0270-271200-678-h01	BF935421	GRIK5	0,619	1,2	0,986	1,0	0,019	1,4	0,788	-1,1	0,487	1,2	0,042	1,3
CM1-BT0019-231299-074-f10	AW369582	GTF2H1	0,284	1,4	0,995	1,0	0,015	1,6	0,382	-1,3	0,788	1,2	0,026	1,6
QV3-OT0065-280600-250-c09	BE833329	H2AFZ	0,505	1,3	0,977	1,1	0,036	1,5	0,712	-1,2	0,740	1,2	0,087	1,4
PM0-OT0019-100500-004-a07	AW879488	HEXB	0,605	1,2	0,941	-1,1	0,082	1,3	0,331	-1,2	0,821	1,1	0,023	1,3
MR3-UT0050-120900-007-g04	BF094594	HIVEP2	0,098	-1,2	0,032	-1,3	0,106	-1,2	1,000	-1,0	0,976	1,0	0,945	1,0
QV2-FT0010-010700-252-g07	BE768509	HLTF	0,104	1,6	0,876	1,1	0,012	1,7	0,319	-1,4	0,971	1,1	0,068	1,5
MR2-HT0756-030700-001-c02	BE715826	HS3ST1	0,437	-1,3	0,955	-1,1	0,046	-1,5	0,699	1,2	0,848	-1,2	0,135	-1,4
MR0-BT0551-060300-102-h03	BE073224	ICMT	0,526	1,2	0,753	-1,1	0,046	1,4	0,144	-1,4	0,769	1,2	0,004	1,6
QV1-ET0180-021200-524-h01	BF881076	IFNGR1	0,883	1,2	0,778	1,2	0,004	1,9	1,000	1,0	0,090	1,7	0,041	1,6
QV2-OT0062-080500-203-h01	AW883691	IQCE	0,607	-1,2	0,462	-1,2	0,016	-1,5	1,000	-1,0	0,461	-1,2	0,323	-1,2
IL3-CT0213-200100-057-G09	AW604114	JAK2	0,887	1,1	0,074	-1,3	0,999	1,0	0,036	-1,4	0,932	-1,1	0,054	1,3
RC0-BN0328-210600-021-b10	BE819344	KCNK2	0,688	-1,1	0,097	1,2	0,843	1,1	0,019	1,4	0,293	1,2	0,397	-1,1
CM3-FT0096-140700-243-f08	BE771837	KIAA0427	0,302	-1,4	0,542	-1,3	0,011	-1,8	0,916	1,1	0,718	-1,2	0,207	-1,4
RC0-AN0040-200700-032-c10	BQ291667	KIF20A	0,019	1,7	0,999	1,0	0,430	1,3	0,025	-1,7	0,274	-1,4	0,510	1,2
QV1-HT0638-230500-207-c04	BF353345	KLK13	0,051	-1,2	0,996	1,0	0,916	-1,0	0,034	1,2	0,155	1,2	0,824	-1,1
RC2-HT0221-061199-031-e09	AW378473	KPNA6	0,033	1,4	0,505	1,2	0,115	1,3	0,333	-1,2	0,784	-1,1	0,793	1,1
MR0-BN0384-121200-201-a05	BF753140	LOC285628	0,033	1,5	0,034	1,4	0,301	1,2	0,968	-1,1	0,508	-1,2	0,680	-1,1
QV4-MT0067-270600-268-e02	BE831904	LOC348262	0,175	-1,4	0,578	-1,2	0,002	-1,6	0,740	1,2	0,544	-1,2	0,043	-1,4
PM0-NN0046-040400-001-h11	AW896256	LOC399947	0,390	-1,3	0,055	-1,4	0,025	-1,5	0,910	-1,1	0,779	-1,2	0,987	-1,0
PM2-CN0033-160200-002-h12	AW842516	MAP2K1	0,546	1,2	0,840	-1,1	0,158	1,4	0,197	-1,4	0,961	1,1	0,027	1,5
QV1-HT0638-230500-207-h03	BE710925	MAP4K3	0,601	1,1	0,994	-1,0	0,072	1,2	0,472	-1,2	0,799	1,1	0,042	1,3
PM3-GN0510-230501-006-a08	BQ368557	MAST4	0,515	-1,4	0,911	1,1	0,068	-1,6	0,231	1,5	0,855	-1,2	0,015	-1,8
MR3-GN0186-171100-007-d08	BG003230	MINPP1	0,433	1,2	1,000	-1,0	0,015	1,4	0,410	-1,2	0,620	1,2	0,013	1,4
RC3-CT0254-230300-028-f04	AW854050	MORC3	0,988	1,1	0,684	-1,2	0,103	1,4	0,590	-1,2	0,348	1,3	0,008	1,6
QV0-AN0014-300600-289-g02	BE811192	MRPL27	0,999	-1,0	0,657	1,2	0,044	-1,4	0,695	1,2	0,137	-1,4	0,003	-1,6
QV4-SN0024-200700-304-c01	BE841209	MTERF	0,053	1,3	0,878	-1,1	0,065	1,2	0,012	-1,3	0,959	-1,0	0,012	1,3
RC0-HT0374-131299-031-c12	AW384219	MYC	0,041	1,6	1,000	-1,0	0,007	1,7	0,038	-1,6	0,998	1,0	0,007	1,7
RC2-BN0131-030400-011-a02	BE006629	MYO6	0,995	1,0	0,717	1,1	0,021	1,4	0,912	1,1	0,102	1,4	0,193	1,3
MR0-BN0115-250900-011-b02	BF154492	NUP50	0,718	1,1	0,954	1,0	0,044	1,3	0,925	-1,1	0,572	1,2	0,130	1,2
RC2-BN0120-240300-011-g05	BE005613	NXT2	0,869	1,1	0,982	-1,0	0,008	1,4	0,703	-1,1	0,146	1,3	0,003	1,5
QV4-FT0004-200700-306-b07	BE768229	OMA1	0,961	1,1	0,773	1,2	0,015	1,6	0,988	1,1	0,132	1,5	0,124	1,4
CM1-BN0020-170200-120-e08	AW992069	OPTN	0,026	-1,6	0,906	1,1	0,754	-1,1	0,007	1,8	0,156	1,4	0,359	-1,3
QV3-BT0381-161299-042-e07	AW372944	PATZ1	1,000	1,0	0,096	-1,1	0,775	1,1	0,173	-1,1	0,879	1,0	0,011	1,2
CM0-HT0245-031199-085-f11	AW379598	PEG10	1,000	1,0	0,695	-1,2	0,071	1,4	0,730	-1,2	0,190	1,4	0,005	1,6
RC2-NT0112-120600-014-h08	BE767038	PLEKHC1	0,431	1,3	0,935	1,1	0,023	1,5	0,728	-1,2	0,721	1,2	0,086	1,4
RC2-ST0301-240300-015-d10	AW821029	PLXND1	0,984	1,0	0,950	1,0	0,050	1,2	1,000	1,0	0,230	1,2	0,148	1,2
QV4-BN0090-270400-190-f10	BE003070	PRDM4	0,045	2,1	0,992	-1,1	0,409	1,4	0,026	-2,2	0,483	-1,5	0,270	1,5
QV4-GN0122-131000-467-g06	BF987914	PRKCE	0,165	-1,8	0,292	-1,5	0,029	-1,9	0,927	1,2	0,981	-1,1	0,649	-1,3
MR1-CI0021-161000-002-b06	BF799915	PSAT1	0,347	-1,4	0,319	1,3	0,985	1,1	0,018	1,8	0,218	1,4	0,509	-1,2
MR0-BN0115-210800-007-f07	BE926021	PTGFRN	0,996	1,0	0,204	1,2	0,565	-1,1	0,464	1,2	0,548	-1,2	0,012	-1,4
QV1-GN0207-131100-489-b09	BG001122	PTPN12	0,484	1,4	0,954	-1,1	0,033	1,7	0,259	-1,5	0,742	1,2	0,010	1,9
CM0-HT0530-060400-320-d06	BE170005	RBM10	0,985	-1,1	0,912	1,2	0,181	-1,6	0,804	1,3	0,499	-1,5	0,048	-1,9
CM1-HT0876-041100-456-d07	BF833830	RCBTB1	0,418	1,4	0,997	1,0	0,044	1,6	0,513	-1,3	0,855	1,2	0,067	1,6
QV1-ET0058-190600-243-c05	BE828856	RCP9	0,655	-1,2	0,976	-1,0	0,029	-1,4	0,846	1,1	0,537	-1,2	0,071	-1,3
CM1-AN0080-011100-537-c12	BF735301	RFX2	0,864	-1,2	0,325	1,5	0,697	-1,3	0,136	1,8	0,999	-1,0	0,040	-1,9
PM3-FT0024-250700-006-g01	BE769211	RGL2	0,989	1,1	0,711	1,2	0,299	-1,3	0,934	1,1	0,283	-1,4	0,037	-1,5
RC0-CT0094-200899-002-E12	AW176766	RIF1	1,000	-1,0	0,892	-1,1	0,122	1,3	0,931	-1,1	0,232	1,3	0,026	1,4
RC0-BT0292-221199-011-E04	AW371401	RNF25	0,111	1,5	0,887	-1,1	0,477	1,2	0,030	-1,7	0,681	-1,2	0,154	1,4

ORESTES	Seq_acc	Símbolo de gene	pAD x N		OD x N		dAD x N		OD x pAD		dAD xpAD		dAD x OD	
			P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F
CM0-CI0096-301000-647-g05	BF801892	SCYE1	0,999	1,0	0,035	1,4	0,980	1,0	0,126	1,4	0,998	1,0	0,081	-1,4
QV1-GN0320-021200-523-g04	BG009484	SH3KBP1	0,043	-1,5	0,981	-1,0	0,952	-1,1	0,086	1,4	0,111	1,4	0,999	-1,0
CM1-FN0107-180700-320-d10	BE838471	SH3PXD2A	0,724	-1,3	0,612	1,3	0,258	-1,5	0,182	1,8	0,947	-1,2	0,021	-2,0
MR4-TN0109-120900-201-d05	BF377286	SLC43A3	0,796	1,2	0,896	-1,1	0,153	1,5	0,446	-1,4	0,790	1,2	0,036	1,6
RC4-CN0007-010900-015-f06	BE927148	SLMAP	0,642	1,2	0,998	1,0	0,043	1,4	0,734	-1,2	0,641	1,2	0,063	1,4
RC0-FN0204-221200-022-a10	BF856405	SMTN	0,999	-1,0	0,327	1,2	0,670	-1,1	0,394	1,2	0,843	-1,1	0,037	-1,3
PM0-UM0018-060700-004-b02	BE774514	SNX14	0,534	1,2	0,744	-1,1	0,061	1,3	0,144	-1,3	0,819	1,1	0,005	1,5
PM0-BN0139-050500-003-e07	BE007242	SRP9	0,236	1,8	1,000	1,0	0,026	2,2	0,257	-1,8	0,925	1,2	0,029	2,1
PM3-HT0909-130900-004-g04	BF356756	ST3GAL3	0,977	-1,1	0,971	1,1	0,100	-1,7	0,863	1,2	0,381	-1,5	0,039	-1,9
QV3-GN0061-160800-296-b07	BE930145	STK24	0,072	-1,5	0,344	-1,3	0,025	-1,5	0,676	1,2	1,000	1,0	0,551	-1,2
RC0-HT0841-220800-025-e08	nd	TAS2R14	0,513	-1,4	0,427	-1,3	0,026	-1,7	1,000	1,0	0,654	-1,3	0,459	-1,3
QV0-OT0033-030600-249-f01	BF360531	TAS2R5	0,973	1,0	0,033	1,2	0,995	-1,0	0,198	1,2	0,920	-1,1	0,018	-1,2
MR3-GN0186-171100-007-d07	BQ367148	TBRG1	0,209	1,3	0,976	1,0	0,003	1,5	0,362	-1,2	0,549	1,2	0,007	1,4
PM3-DT0037-231299-001-f06	AW364677	TCEAL8	0,219	1,2	0,111	1,2	0,009	1,3	1,000	1,0	0,775	1,1	0,675	1,1
CM2-CI0135-101100-491-b12	BF807334	THUMPD3	0,998	1,0	0,611	-1,2	0,353	1,3	0,624	-1,2	0,601	1,2	0,033	1,5
MR3-ST0290-110100-201-b10	AW582658	TIMM9	0,766	1,1	0,477	1,2	0,001	1,6	0,994	1,0	0,057	1,4	0,038	1,4
CM0-BN0106-170300-293-g07	BE004431	TMCO3	0,418	1,3	0,586	-1,2	0,376	1,3	0,061	-1,6	0,998	-1,0	0,033	1,6
QV4-OT0035-240800-371-f05	BF360676	TMEM138	0,370	-1,2	0,920	-1,1	0,271	1,2	0,687	1,1	0,016	1,4	0,084	1,2
RC2-BN0123-170300-011-g10	BE006093	TOX3	0,827	1,2	0,494	-1,3	0,438	1,3	0,191	-1,5	0,972	1,1	0,030	1,7
MR2-UM0025-280300-101-h12	AW796030	TRA16	0,821	-1,2	0,895	1,1	0,179	-1,4	0,473	1,3	0,803	-1,2	0,043	-1,5
PM0-CI0047-181000-001-G07	BF800354	TSGA14	0,549	1,3	0,527	-1,2	0,238	1,3	0,083	-1,6	0,991	1,1	0,013	1,7
CM0-NN0001-100300-271-f03	AW892064	TTC13	0,875	1,2	0,839	-1,1	0,151	1,4	0,478	-1,3	0,693	1,2	0,026	1,6
PM0-UM0018-130500-003-f10	AW795371	TTK	0,682	-1,3	0,015	-1,7	0,059	-1,6	0,378	-1,4	0,678	-1,3	0,931	1,1
QV3-OT0064-060400-144-e08	AW884244	UBE2L3	0,465	-1,2	0,998	-1,0	0,012	-1,5	0,560	1,2	0,545	-1,2	0,019	-1,5
MR2-CT0592-311000-006-a08	BF756600	UBL4A	0,353	-1,9	0,261	-1,8	0,044	-2,4	1,000	1,0	0,904	-1,3	0,798	-1,3
CM0-BT0152-250899-043-f07	AW176106	UBLCP1	0,495	1,3	0,357	-1,3	0,535	1,2	0,039	-1,7	0,992	-1,1	0,025	1,6
RC3-NT0221-131200-011-b06	BF930903	USP20	0,750	-1,2	0,996	-1,0	0,028	-1,5	0,849	1,1	0,440	-1,3	0,047	-1,4
QV1-BT0631-210800-337-d02	BE926620	UTP20	0,529	1,3	0,860	-1,1	0,101	1,4	0,200	-1,5	0,911	1,1	0,018	1,6
QV1-CI0175-021100-452-h05	BF803592	VPS39	0,069	-1,3	0,783	-1,1	0,024	-1,3	0,302	1,2	1,000	1,0	0,175	-1,2
PM3-HT0175-300999-001-g06	AW367978	WBP5	0,500	1,5	0,219	1,7	0,036	2,1	0,994	1,1	0,742	1,4	0,807	1,3
RC2-ET0019-200600-017-f12	BF358810	WRNIP1	0,125	1,4	1,000	1,0	0,043	1,4	0,143	-1,4	1,000	1,0	0,051	1,4
QV4-EN0032-190500-223-c06	BE826160	XRCC6BP1	0,685	1,2	0,825	-1,1	0,231	1,2	0,276	-1,3	0,950	1,1	0,042	1,4
MR3-GN0187-201100-010-f03	BG003841	ZBTB7B	0,036	1,3	0,003	1,3	0,003	1,3	0,974	1,0	0,982	1,0	1,000	-1,0
MR0-HT0167-141199-002-h03	BE144581	ZFYVE21	0,268	-1,7	0,142	-1,7	0,032	-2,0	1,000	-1,0	0,927	-1,2	0,895	-1,2
RC0-CN0028-090200-031-f11	AW842249	ZNF266	0,080	1,5	0,904	-1,1	0,083	1,4	0,022	-1,7	0,978	-1,1	0,018	1,6
PM2-HT0130-150999-001-b08	BE141963	ZNF394	0,388	1,4	0,785	1,2	0,012	1,7	0,844	-1,2	0,632	1,3	0,102	1,5
MR0-HT0240-081199-001-b06	AW379158	ZNF559	0,546	1,2	1,000	1,0	0,004	1,6	0,576	-1,2	0,278	1,3	0,005	1,6
RC1-GN0198-011200-013-e09	BG009053	ZNF84	0,533	1,2	1,000	1,0	0,004	1,4	0,563	-1,1	0,263	1,2	0,004	1,4
QV3-SN0022-010600-218-e02	BE841175	NA	0,162	1,3	0,995	-1,0	0,002	1,5	0,111	-1,3	0,588	1,2	0,001	1,5
RC4-GN0139-131100-021-d04	BQ367012	NA	0,102	1,3	0,972	1,0	0,002	1,5	0,203	-1,2	0,708	1,1	0,005	1,4
RC0-FN0025-230500-031-b01	BF370163	NA	0,926	1,1	0,736	-1,2	0,068	1,5	0,460	-1,3	0,411	1,4	0,006	1,8
CM3-MT0116-070900-326-c08	BF360225	NA	0,935	-1,1	0,747	1,1	0,115	-1,3	0,488	1,2	0,519	-1,2	0,012	-1,4
QV0-ST0294-240300-173-a03	AW819990	NA	0,802	1,1	0,927	-1,1	0,051	1,4	0,496	-1,2	0,514	1,2	0,012	1,5
QV1-FT0203-131100-468-d04	BF858110	NA	0,483	1,2	0,884	-1,1	0,070	1,4	0,190	-1,3	0,883	1,1	0,013	1,5
QV0-ET0149-011100-464-g09	BQ330630	NA	0,730	-1,2	1,000	1,0	0,021	-1,8	0,688	1,3	0,395	-1,4	0,017	-1,8
MR4-ST0121-060200-002-e10	AW809603	NA	0,251	1,5	0,629	-1,2	0,223	1,4	0,033	-1,8	0,995	-1,0	0,018	1,7
PM1-HT0350-201299-004-a08	AW383513	NA	0,815	1,1	0,977	1,1	0,008	1,6	0,949	-1,1	0,179	1,4	0,021	1,5
RC4-MT0235-061200-011-d12	BQ334714	NA	0,710	1,1	0,948	-1,1	0,072	1,3	0,434	-1,2	0,697	1,2	0,021	1,4
RC4-NT0163-281100-011-c11	BQ344701	NA	0,994	-1,0	0,534	-1,1	0,371	1,1	0,808	-1,1	0,371	1,2	0,027	1,3
QV0-FN0066-120600-262-e11	BE836530	NA	0,991	-1,1	0,117	1,5	0,907	-1,1	0,133	1,5	0,993	-1,1	0,027	-1,6
PM0-BT0726-300300-001-G04	BE091205	NA	0,911	1,2	0,660	-1,2	0,323	1,4	0,376	-1,4	0,850	1,2	0,035	1,7
RC0-HT0934-120900-035-g01	BF357330	NA	0,933	-1,1	0,954	1,1	0,108	-1,4	0,732	1,2	0,508	-1,3	0,035	-1,5
CM1-NN1006-200300-154-d12	AW900549	NA	0,669	1,3	0,901	-1,1	0,158	1,5	0,332	-1,4	0,900	1,2	0,038	1,7
MR0-HT0241-131299-002-e09	BQ348715	NA	0,727	1,2	1,000	-1,0	0,047	1,4	0,700	-1,2	0,576	1,2	0,042	1,4

ORESTES	Seq_acc	Símbolo de gene	pAD x N		OD x N		dAD x N		OD x pAD		dAD xpAD		dAD x OD	
			P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F
CM1-NT0271-131200-636-c02	BF931100	NA	0,866	-1,1	0,997	-1,0	0,026	-1,6	0,932	1,1	0,306	-1,4	0,042	-1,5
RC3-CN0018-020800-016-f03	BE825264	NA	0,401	1,5	0,952	1,1	0,012	2,0	0,666	-1,3	0,618	1,3	0,043	1,8
RC0-BN0280-310700-025-h02	BF329787	NA	0,995	1,0	0,982	1,0	0,018	1,3	1,000	1,0	0,093	1,2	0,043	1,2
MR4-TN0113-110900-102-f09	BF092772	NA	0,219	1,3	0,988	-1,0	0,091	1,3	0,133	-1,4	1,000	1,0	0,045	1,4
RC2-BT0642-130300-017-f05	BQ302945	NA	0,358	1,2	1,000	-1,0	0,048	1,4	0,356	-1,2	0,915	1,1	0,048	1,4
MR3-GN0187-271100-016-b05	BQ367273	NA	0,673	-1,2	0,927	1,1	0,167	-1,3	0,367	1,3	0,907	-1,1	0,048	-1,4
CM1-CI0132-081100-552-d02	BQ324295	NA	0,291	1,4	0,332	-1,3	0,748	1,2	0,015	-1,8	0,774	-1,2	0,050	1,5
RC2-CS0018-250900-011-b04	BF229778	NA	0,367	1,2	0,728	1,1	0,014	1,4	0,866	-1,1	0,675	1,1	0,135	1,2
QV4-HT0538-220900-407-b05	BF351582	NA	0,546	1,2	0,993	1,0	0,241	-1,2	0,686	-1,1	0,029	-1,5	0,149	-1,3
CM1-BT0742-020500-211-h11	BF332684	NA	0,069	1,7	0,761	-1,2	0,624	1,2	0,010	-2,0	0,419	-1,4	0,150	1,5
MR0-AN0083-041000-006-a08	BF733221	NA	0,925	-1,1	0,050	-1,3	0,792	-1,1	0,348	-1,2	0,998	-1,0	0,292	1,2
CM0-BT0793-030600-413-c06	BQ309790	NA	0,924	-1,1	0,674	-1,2	0,034	-1,7	0,987	-1,1	0,279	-1,5	0,305	-1,4
PM3-HT0175-300999-001-g08	BQ356322	NA	0,500	1,7	0,653	1,4	0,038	2,4	0,972	-1,2	0,755	1,4	0,350	1,7
MR3-OT0005-170200-101-d01	AW877813	NA	0,929	-1,1	0,031	-1,3	0,438	-1,1	0,261	-1,2	0,904	-1,1	0,500	1,1
QV4-CT0491-240800-378-h08	BF336162	NA	0,050	1,3	0,319	1,1	0,969	1,0	0,598	-1,1	0,111	-1,2	0,573	-1,1
MR4-TN0114-110900-101-e07	BF092878	NA	0,016	-1,8	0,435	-1,3	0,053	-1,5	0,235	1,4	0,783	1,2	0,644	-1,2
QV4-UM0094-160300-136-g07	BF378928	NA	0,359	1,2	0,160	1,2	0,015	1,4	0,999	1,0	0,706	1,1	0,698	1,1
MR4-BT0358-130700-010-h10	BE693648	NA	0,109	1,3	0,074	1,3	0,006	1,4	0,997	-1,0	0,892	1,1	0,700	1,1
PM2-KT0007-221200-006-g01	BF739130	NA	0,400	-1,3	0,039	-1,4	0,006	-1,6	0,847	-1,1	0,467	-1,3	0,865	-1,1
QV0-ST0294-100400-185-h11	BQ364322	NA	0,016	-1,6	0,176	-1,3	0,101	-1,3	0,487	1,2	0,635	1,2	0,991	-1,0
PM0-BT0649-250200-001-e03	BF332048	NA	0,678	1,3	0,055	1,6	0,040	1,6	0,665	1,3	0,588	1,3	0,999	1,0

177 genes identificados pela ANOVA estão listados em ordem alfabética pelos símbolos dos genes. Em cada combinação, os genes são considerados diferencialmente expressos com P valor < 0,05 (teste de Tukey). ORESTES, identificação da ORESTES. Seq_acc, número de acesso no *GeneBank*. P, p valor. F, fold. Nd, não determinado. NA, não anotado.

8 REFERÊNCIAS

Al-Kandari W, Koneni R, Navalgund V, Aleksandrova A, Jambunathan S, Fontes JD. The zinc finger proteins ZXDA and ZXDC form a complex that binds CIITA and regulates MHC II gene transcription. *J Mol Biol.* 2007;369:1175-87.

American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 4th Ed. Washington, D.C.: American Psychiatric Association, 1994.

Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology.* 1992;42:631-9.

Berg L, McKeel DW, Miller JP. Clinicopathologic studies in cognitively healthy aging and Alzheimer's disease: relation to histologic markers to Dementia, severity, age, sex and apolipoprotein E genotype. *Arch Neurol.* 1998; 55:326-35.

Bierer LM, Hof PR, Purohit DP. Neocortical neurofibrillary tangles correlate with dementia severity in Alzheimer's disease. *Arch Neurol.* 1995;52:81-8.

Blalock EM, Geddes JW, Chen KC, Porter NM, Markesbery WR, Landfield PW. Incipient Alzheimer's disease: microarray correlation analyses reveal major transcriptional and tumor suppressor responses. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101:2173-78.

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

Braga-Neto U, Dougherty E. Bolstered error estimation. *Pattern Recognition.* 2004;37:1267-81.

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

Bunney WE, Bunney BG, Vawter MP, Tomita H, Li J, Evans SJ, et al. Microarray technology: a review of new strategies to discover candidate vulnerability genes in psychiatric disorders. *Am J Psychiatry.* 2003;160:657-66.

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

Chen J, Ji C, Gu S, Zhao E, Dai J, Huang L, et al. Isolation and identification of a novel cDNA that encodes human yrdC protein. *J Hum Genet*. 2003;48:164-9.

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

Corder EH, Saunders AM, Risch NJ, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC Jr, et al. Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Genet*. 1994;7:180-4.

Counts SE, He B, Che S, Ikonomic MD, DeKosky ST, Ginsberg SD, et al. Alpha7 nicotinic receptor up-regulation in cholinergic basal forebrain neurons in Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 2007;64:1771-6.

Dai Y, Yang Y, MacLeod V, Yue X, Rapraeger AC, Shriver Z, et al. HSulf-1 and HSulf-2 are potent inhibitors of myeloma tumor growth in vivo. *J Biol Chem*. 2005;280:40066-73.

Del Ser T, Hachinski V, Merskey H, Munoz DG. Alzheimer's disease with and without cerebral infarcts. *J Neurol Sci*. 2005;231:3-11.

Di Lello P, Miller Jenkins LM, Mas C, Langlois C, Malitskaya E, Fradet-Turcotte A, et al. p53 and TFII α share a common binding site on the Tfb1/p62 subunit of TFIIH. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105:106-11.

Dias NE, Correa RG, Verjovski-Almeida S. Shotgun sequencing of the human transcriptome with ORF expressed sequence tags. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:3491–6.

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

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

Fleige S, Pfaffl MW. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med.* 2006;27:126-39.

Gärtner U, Holzer M, Arendt T. Elevated expression of p21ras is an early event in Alzheimer's disease and precedes neurofibrillary degeneration. *Neuroscience.* 1999;91:1-5.

Geddes JW, Tekirian TL, Soultanian NS. Comparison of neuropathologic criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 1997;18:S99-105.

Gévry N, Chan HM, Laflamme L, Livingston DM, Gaudreau L. p21 transcription is regulated by differential localization of histone H2A.Z. *Genes Dev.* 2007;21:1869-81.

Gibson PH, Tomlinson BE. Numbers of Hirano bodies in the hippocampus of normal and demented people with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci.* 1977;33:199-206.

Gimm O, Chi H, Dahia PL, Perren A, Hinze R, Komminoth P, et al. Somatic mutation and germline variants of MINPP1, a phosphatase gene located in proximity to PTEN on 10q23.3, in follicular thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:1801-5.

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

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

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

Gomes LI, Silva RL, Stolf BS, Cristo EB, Hirata, R, Soares FA, et al. Comparative analysis of amplified and nonamplified RNA for hybridization in cDNA microarray. *Anal Biochem.* 2003;321:244-51.

Griffin RJ, Moloney A, Kelliher M, Johnston JA, Ravid R, Dockery P, et al. Activation of Akt/PKB, increased phosphorylation of Akt substrates and loss and altered distribution of Akt and PTEN are features of Alzheimer's disease pathology. *J Neurochem*. 2005;93:105-17.

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;8:151-62.

Haroutunian V, Perl DP, Purohit DP. Regional distribution of neuritic plaques in the nondemented elderly and subjects with very mild Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 1998; 55:1185-91.

Herrup K, Arendt T. Re-expression of cell cycle proteins induces neuronal cell death during Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2002;4:243-7.

Herrup K, Yang Y. Cell cycle regulation in the postmitotic neuron: oxymoron or new biology? *Nat Rev Neurosci*. 2007;8:368-78.

Ho JS, Ma W, Mao DY, Benchimol S. p53-Dependent transcriptional repression of c-myc is required for G1 cell cycle arrest. *Mol Cell Biol*. 2005;25:7423-31.

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

Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, Baker M, Froelich S, Houlden H, et al. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature*. 1998;393:702-5.

Iqbal K, Alonso Adel C, Chen S, Chohan MO, El-Akkad E, Gong CX, et al. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1739:198–210.

Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N, Ihara Y. Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron*. 1994;13:45-53.

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

Jeganathan KB, Malureanu L, van Deursen JM. The Rae1-Nup98 complex prevents aneuploidy by inhibiting securin degradation. *Nature*. 2005;438:1036-39.

Jellinger KA, Bancher C. Proposals for re-evaluation of current autopsy criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 1997;18:S55-65.

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

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

Kim S, Dougherty ER, Barrera J, Chen Y, Bittner ML, Trent JM. Strong feature sets from small samples. *J Comput Biol*. 2002;9:127-46.

Lanni C, Racchi M, Mazzini G, Ranzenigo A, Polotti R, Sinforiani E, et al. Conformationally altered p53: a novel Alzheimer's disease marker? *Mol Psychiatry*. 2008;13:641-7.

Levy-Lahad E, Wijsman EM, Nemens E, Anderson L, Goddard KA, Weber JL, et al. A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1. *Science*. 1995;269:970-3.

Li B, Chohan MO, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Disruption of microtubule network by Alzheimer abnormally hyperphosphorylated tau. *Acta Neuropathol*. 2007;113:501-11.

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

Lorenzo A, Yankner BA. Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91:12243-7.

Loring JF, Wen X, Lee JM, Seilhamer J, Somogyi R. A gene expression profile of Alzheimer's disease. *DNA Cell Biol.* 2001;20:683-95.

Lyness SA, Zarow C, Chui HC. Neuron loss in key cholinergic and aminergic nuclei in Alzheimer disease: a meta-analysis. *Neurobiol Aging.* 2003;24:1-23.

Markesbery WR. Neuropathological Criteria for the Diagnosis of Alzheimer's Disease. *Neurobiol of Aging.* 1997;18:S13–9.

McKee AC, Kosik KS, Kowall NW. Neuritic pathology and dementia in Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 1991; 30:156-65.

McKhann G, Drachman D, Folstein M. Clinical diagnosis of Alzheimer's Disease: Report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Service Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology.* 1984;34:939-44.

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

Mirra SS, Gearing M, Nash F. Neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology.* 1997; 49:S14-6.

Mirra SS, Heyman A, McKeel DW. The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II: standardization of the neuropathological assessment of Alzheimer's disease. *Neurology.* 1991;41:479-86.

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

Morris, JC. The Clinical Dementia Rating Scale (CDR): Current version and scoring rules. *Neurology.* 1993;43:2412–3.

Mouton PR, Martin LJ, Calhoun ME. Cognitive decline strongly correlates with cortical atrophy in Alzheimer's dementia. *Neurobiol Aging.* 1998;19:371-7.

Moynihan TP, Ardley HC, Leek JP, Thompson J, Brindle NS, Markham AF, et al. Characterization of a human ubiquitin-conjugating enzyme gene UBE2L3. *Mamm Genome*. 1996;7:520-5.

Nagasaka Y, Dillner K, Ebise H, Teramoto R, Nakagawa H, Lilius L, et al. A unique gene expression signature discriminates familial Alzheimer's disease mutation carriers from their wild-type siblings. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:14854-9.

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

Parachikova A, Agadjanyan MG, Cribbs DH, Blurton-Jones M, Perreau V, Rogers J, et al. Inflammatory changes parallel the early stages of Alzheimer disease. *Neurobiol Aging*. 2007;28:1821-33.

Pasinetti GM. Use of cDNA microarray in the search for molecular markers involved in the onset of Alzheimer's disease dementia. *J Neurosci Res*. 2001;65:471-6.

Pomponi M, Bria P, Pomponi M. Is Alzheimer's disease a synaptic disorder? *J Alzheimers Dis*. 2008;13:39-47.

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

Puskas LG, Zvara A, Hackler L Jr, Van Hummelen P. RNA amplification results in reproducible *microarray* data with slight ratio bias. *Biotechniques*. 2002;32:1330-4, 1336, 1338, 1340.

Ray S, Britschgi M, Herbert C, Takeda-Uchimura Y, Boxer A, Blennow K, et al. Classification and prediction of clinical Alzheimer's diagnosis based on plasma signaling proteins. *Nat Med*. 2007;13:1359-62.

Roberson ED, Searce-Levie K, Palop JJ, Yan F, Cheng IH, Wu T, et al. Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science*. 2007;316:750-4.

Rovelet-Lecrux A, Hannequin D, Raux G, Le Meur N, Laquerrière A, Vital A., APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat Genet*. 2006;38:24-6.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second ed. Cold Spring Harbor, 1989, NY.

Samuel W, Masliah E, Hill LR, Butters N, Terry R. Hippocampal connectivity and Alzheimer's dementia: effects of synapse loss and tangle frequency in a two-component model. *Neurology*. 1994; 44:2081-8.

Santa-Mara I, Santpere G, MacDonald MJ, Gomez de Barreda E, Hernandez F, Moreno FJ, et al. Coenzyme q induces tau aggregation, tau filaments, and Hirano bodies. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2008;67:428-34.

Schliebs R. Basal forebrain cholinergic dysfunction in Alzheimer's disease—interrelationship with beta-amyloid, inflammation and neurotrophin signaling. *Neurochem Res*. 2005;30:895-908.

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

Schoor O, Weinschenk T, Hennenlotter J, Corvin S, Stenzl A, Rammensee HG, et al. Moderate degradation does not preclude microarray analysis of small amounts of RNA. *Biotechniques*. 2003;35:1192-6, 1198-201.

Selkoe DJ, Podlisny MB. Deciphering the genetic basis of Alzheimer's disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2002;3:67-99.

Selkoe DJ. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science*. 2002;298:789-91.

Selkoe DJ. Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *Ann N Y Acad Sci*. 2000; 924:17-25.

Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, et al. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med*. 2008;14:837-42.

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

Shirane M, Nakayama KI. Protrudin induces neurite formation by directional membrane trafficking. *Science*. 2006;314:818-21.

Shoemaker DD, Linsley PS. Recent developments in DNA microarrays. *Curr Opin Microbiol*. 2002;5:334-7.

Silva PJS, et al. Feature selection algorithms to find strong genes. *Pattern Recognition Letters*. 2005;26:1444-53.

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

Stern Y. Cognitive reserve and Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 2006;20:S69-74.

Sugano T, Nitta M, Ohmori H, Yamaizumi M. Nuclear accumulation of p53 in normal human fibroblasts is induced by various cellular stresses which evoke the heat shock response, independently of the cell cycle. *Jpn J Cancer Res*. 1995;86:415-8.

Takasugi N, Tomita T, Hayashi I, Tsuruoka M, Niimura M, Takahashi Y, et al. The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex. *Nature*. 2000;403:418-421.

Terry RD, Masliah E, Salmon DP. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol*. 1991;30:572-80.

The National Institute on Aging and Reagan Institute Working Group. Consensus recommendations for the postmortem diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 1997;18:S1-2.

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

Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, et al. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature*. 2002;416:535-9.

Wang E, Miller LD, Ohnmacht GA, Liu ET, Marincola FM. High-fidelity mRNA amplification for gene profiling. *Nat Biotechnol.* 2000;18:457-9.

Webber KM, Raina AK, Marlatt MW, Zhu X, Prat MI, Morelli L, Casadesus G, Perry G, Smith MA. The cell cycle in Alzheimer disease: a unique target for neuropharmacology. *Mech Ageing Dev.* 2005;126:1019-25.

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

Wong RW, Blobel G, Coutavas E. Rae1 interaction with NuMA is required for bipolar spindle formation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103:19783-7.

World Health Organization (WHO). The ICD-10 classification of mental and behavioral disorders. Diagnostic criteria for research. Geneva: World Health Organization, 1993.

Xu M, Shibayama H, Kobayashi H. Granulovacuolar degeneration in the hippocampal cortex of aging and demented patients-a quantitative study. *Acta Neuropathol.* 1992;85:1-9.

Yang Y, Herrup K. Cell division in the CNS: protective response or lethal event in post-mitotic neurons? *Biochim Biophys Acta.* 2007;1772:457-66.

Yang Y, Varvel NH, Lamb BT, Herrup K. Ectopic cell cycle events link human Alzheimer's disease and amyloid precursor protein transgenic mouse models. *J Neurosci.* 2006;26:775-84.

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

Zhang B, Kirov S, Snoddy J. WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. *Nucleic Acids Res.* 2005;33:W741-8.

Zhang X, Chen HM, Jaramillo E, Wang L, D'Mello SR. Histone deacetylase-related protein inhibits AES-mediated neuronal cell death by direct interaction. *J Neurosci Res.* 2008;86:2423-31.

Zhang X, Li F, Bulloj A, Zhang YW, Tong G, Zhang Z, et al. Tumor suppressor PTEN affects tau phosphorylation, aggregation, and binding to microtubules. *FASEB J.* 2006;20:1272-4