

Tatiane Katsue Furuya Mazzotti

**ANÁLISE QUANTITATIVA DA
EXPRESSÃO DE GENES RELEVANTES
PARA O ENVELHECIMENTO E PARA A
DOENÇA DE ALZHEIMER**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola Paulista
de Medicina, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

São Paulo
2011

Tatiane Katsue Furuya Mazzotti

**ANÁLISE QUANTITATIVA DA
EXPRESSÃO DE GENES RELEVANTES
PARA O ENVELHECIMENTO E PARA A
DOENÇA DE ALZHEIMER**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola Paulista
de Medicina, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Orientadora: Prof^a Dr^a Marília de Arruda
Cardoso Smith

São Paulo
2011

Mazzotti, Tatiane Katsue Furuya

Análise quantitativa da expressão de genes relevantes para o envelhecimento e para a Doença de Alzheimer/Tatiane Katsue Furuya

Mazzotti.-- São Paulo, 2011.

xxv, 76f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Morfologia.

Título em inglês: Quantitative expression analysis of genes related to aging and Alzheimer's Disease.

1. Doença de Alzheimer. 2. Envelhecimento. 3. Expressão gênica. 4. Marcadores biológicos.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E GENÉTICA**

Chefe do Departamento: Prof^a Dr^a Sima Godosevicius

Coordenadora do Curso de Pós-graduação: Prof^a Dr^a Janete Maria Cerutti

Tatiane Katsue Furuya Mazzotti

**ANÁLISE QUANTITATIVA DA
EXPRESSÃO DE GENES RELEVANTES
PARA O ENVELHECIMENTO E PARA A
DOENÇA DE ALZHEIMER**

Presidente da banca: Prof^a Dr^a Marília de Arruda Smith

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Spencer Luiz Marques Payão

Prof^a Dr^a Sintia Iole Nogueira Belangero

Prof^a Dr^a Dorotéia Rossi Silva Souza

Aprovada em: ____/____/____

Este estudo foi desenvolvido na seguinte instituição:

Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina (UNIFESP/EPM)

Departamento de Morfologia e Genética
Disciplina de Genética

Auxílio financeiro:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

DEDICATÓRIA

*Ao meu marido e melhor amigo,
Diego, pelo amor, compreensão e apoio
durante a concretização deste trabalho
e em todos os demais momentos da vida.
Sem ele nenhum sonho seria possível !!!*

AGRADECIMENTOS

Finalizada mais uma etapa importante da minha vida, não poderia deixar de expressar o meu mais profundo agradecimento a todos aqueles que me apoiaram e contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos meus pais, Carmem e Jairo, meu eterno agradecimento pela vida e pelo amor incondicional que nos une. Sem vocês não teria conquistado tudo o que tenho hoje e não teria chegado tão longe. Obrigada por acreditarem em mim sempre.

À minha irmã Thaisa, pois vencemos juntas todas as batalhas e dificuldades que a vida nos apresentou. Sem você minha vida teria sido vazia e não teria tido com quem compartilhar tantas conquistas.

Ao meu marido Diego, minha razão de seguir sempre em frente. Com você a vida se torna muito mais fácil e as dificuldades muito menores. Obrigada pelo apoio, pela torcida, pelas palavras de incentivo, pelas noites acordado ao meu lado enquanto eu escrevia minha dissertação e por lê-la milhões de vezes. Acima de tudo, agradeço por me ajudar a correr atrás dos meus sonhos e lutar sempre com determinação ao meu lado.

Agradeço à minha orientadora, Prof^a Dr^a Marília de Arruda Cardoso Smith, pelos ensinamentos, pela confiança, pela oportunidade e por fazer parte do meu crescimento profissional, me incentivando sempre.

Um agradecimento em especial às amigas e madrinhas de casamento: Van e Pat. O destino as colocou em minha vida e com vocês eu cresci muito. Obrigada pela companhia nos momentos de tensão e indecisão, pelas risadas, pelos conselhos, por não me deixarem desistir nunca e por estarem sempre disponíveis para mim. Sem vocês não seria metade do que sou hoje.

Às amigas Sintia, Fê Bellucco, Ianna e Mari por me incentivarem sempre, pelas palavras de conforto, por compartilharem tantos bons momentos comigo. Vocês são muito especiais e as guardo em um lugar bem especial no meu coração.

Às minhas “irmãs” de graduação Van, Mari, Jú, Rô e Pri pela amizade inabalável que nos une.

Ao casal Fewis e Léo, ombros amigos que tanto me escutaram e apoiaram. Obrigada pelas risadas e momentos de alegrias que compartilhamos juntos.

Às professoras Gianna, Maria Isabel e Janete pela amizade, pelas palavras em momentos de aflição, pelos ensinamentos sobre genética e sobre a vida. Janete, obrigada também pela excelente coordenação do nosso programa de Pós-graduação.

A todos os meus amigos eternos da Disciplina de Genética: Fewis, Léo, Mari, Pat, Thais, Dani, Ianna, Carol, Betty, Ana, Tatinha, Marquinhos, Van, Fe Bellucco, Sintia, Deni, Núbia, Roberta, Stella, Renata, Leslie, Bianca, Mônica e as meninas de Iniciação, Belisa e Mari, por estarem presentes em todos os momentos de risadas, descontração, festinhas, angústias e simplesmente por fazerem parte da minha história.

Às funcionárias da Disciplina de Genética Cleidoca, Mara, Regina e Sylvinha, grandes companheiras de risadas e desabafos.

Ao Prof Dr Spencer Luiz Marques Payão pela colaboração e amostras fornecidas. Também agradeço ao seu grupo de pesquisa da FAMEMA pelo carinho e ajuda no transporte e processamento das amostras.

Ao Prof Dr Gustavo Turecki, pela colaboração e amostras de cérebro fornecidas pelo Brain Bank - Douglas Hospital Research Center (Montreal, Canadá).

Ao Dr Paulo Bertolucci, pela colaboração no recrutamento dos pacientes com Doença de Alzheimer pelo Departamento de Neurologia da UNIFESP.

Ao grupo do Alzheimer, pela união, pelas discussões construtivas e pelo companheirismo durante a execução do projeto.

À minha querida amiga Karina, que acompanhou toda minha trajetória desde o colégio e esteve sempre ao meu lado. Sua presença foi essencial na escolha da carreira que eu decidi seguir.

Aos meus amigos do Colégio Etapa, sinto falta de vocês no meu dia-a-dia.

À Carol, que mesmo distante, sempre esteve presente!!! Aprendi muito com você durante todos esses anos de amizade.

Aos pacientes com Doença de Alzheimer, principal alvo desta investigação científica.

Aos meus familiares, padrinhos, primos, tios, avós e aos que já partiram, meus sinceros agradecimentos por torcerem por mim sempre e por participarem do meu crescimento como pessoa e como profissional.

Ao Vavá, Adriana e seu Osvaldo, pela companhia, pela torcida e por acompanharem de perto essa conquista.

A todos os professores e amigos da UNIFESP que participaram da minha formação científica.

A todos aqueles que dedicam suas vidas à pesquisa e que acreditam nela.

Aos meus novos companheiros de trabalho, que me acolheram tão bem. Fico muito feliz por vocês fazerem parte desta nova fase da minha vida. Sei que ainda vou aprender muito com vocês.

Ao CNPq, CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro e à UNIFESP, pela estrutura cedida para a realização deste trabalho.

Aos integrantes da minha banca, pelas sugestões, comentários e correções. Vocês acrescentaram muito neste trabalho.

***Meus sinceros agradecimentos a todos que fizeram
parte da construção de mais essa conquista!!!***

SUMÁRIO

Sumário

DEDICATÓRIA.....	vi
AGRADECIMENTOS	viii
SUMÁRIO	xii
LISTAS.....	xv
RESUMO	xxiii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivos	3
2 REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1 Envelhecimento.....	6
2.2 Doença de Alzheimer	8
2.2.1 Características Gerais	9
2.2.2 Aspectos Clínicos e Neuropatológicos.....	10
2.2.3 Aspectos Genéticos.....	15
2.2.4 Expressão gênica como ferramenta para descoberta de biomarcadores para a Doença de Alzheimer	18
2.2.5 Genes potencialmente relevantes para a Doença de Alzheimer.....	19
2.2.5.1 Gene <i>LR11</i> (<i>low-density lipoprotein receptor relative with 11 binding repeats</i>)	20
2.2.5.2 Gene <i>SNAP25</i> (<i>synaptosomal-associated protein, 25kDa</i>)	22
2.2.5.3 Gene <i>SIRT1</i> [<i>sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 1 (S. cerevisiae)</i>].....	24
3 MÉTODOS.....	28
3.1 Casuística	28
3.1.1 Leucócitos de Sangue Periférico	28
3.1.2 Tecido Cerebral.....	29
3.1.3 Comitê de Ética	30
3.2 Metodologia.....	30
3.2.1 Extração de RNA e síntese de cDNA	30
3.2.2 qRT-PCR (<i>quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>)	32
3.2.3 Análise Estatística	34
4 RESULTADOS.....	38
4.1 Gene <i>LR11</i>	38
4.1.1 Expressão em leucócitos de sangue periférico.....	38
4.1.2 Expressão em tecido cerebral	39
4.1.3 Comparação da expressão entre leucócitos de sangue periférico e tecido cerebral	40
4.2 Gene <i>SNAP25</i>	42

4.2.1 Expressão em leucócitos de sangue periférico	42
4.2.2 Expressão em tecido cerebral	42
4.2.3 Comparação da expressão entre leucócitos de sangue periférico e tecido cerebral	45
4.3 Gene <i>SIRT1</i>	45
4.3.1 Expressão em leucócitos de sangue periférico	45
4.3.2 Expressão em tecido cerebral	45
4.3.3 Comparação da expressão entre leucócitos de sangue periférico e tecido cerebral	47
5 DISCUSSÃO	51
5.1 Gene <i>LR11</i>	51
5.2 Gene <i>SNAP25</i>	52
5.3 Gene <i>SIRT1</i>	54
6 CONCLUSÕES	58
7 ANEXOS	61
8 REFERÊNCIAS.....	72
Abstract	
Apêndices	
Bibliografia Consultada	

LISTAS

Lista de Figuras

- Figura 1.** População (em milhões de habitantes) de crianças (0 a 14 anos), jovens e adultos (15 a 59 anos) e idosos (60 anos ou mais) no Brasil, estimada para o período de 1940 a 2050.....7
- Figura 2.** Número estimado (em milhões) de indivíduos com demência após os 60 anos de idade em países desenvolvidos e em países em desenvolvimento no ano 2001, com projeções para os anos 2020 e 2040.....8
- Figura 3.** Prevalência de demência e Doença de Alzheimer em função da idade em uma população brasileira.....10
- Figura 4.** Placas neuríticas ou senis e emaranhados neurofibrilares no córtex cerebral de pacientes com Doença de Alzheimer.....11
- Figura 5.** Hipótese amilóide *versus* hipótese tau. **(a)** De acordo com a hipótese amilóide, o processamento patológico da Proteína Precursora β -Amilóide leva ao aumento da proteína β -Amilóide no cérebro e à formação das placas senis. As placas e/ou peptídeos β -Amilóide podem levar à morte neuronal. Sugere-se que a patologia da tau é secundária a patologia amilóide e ambas levam à morte celular. A perda cognitiva, e conseqüentemente a demência, ocorrem como resultado da formação das placas senis, da perda neuronal, do efeito direto de β -Amilóide ou da combinação desses. **(b)** A hipótese tau enfatiza o papel da tau e dos emaranhados neurofibrilares como responsáveis pela perda celular e demência. Ela também reconhece a via amilóide, mas enfatiza que ambas são independentes.....14
- Figura 6.** Fatores associados à forma familiar e esporádica da Doença de Alzheimer e as vias patogênicas fundamentais relacionadas à doença.....17
- Figura 7.** Síntese de cDNA a partir de RNA total, seguido de amplificação por qRT-PCR, por meio do princípio do ensaio *TaqMan*. Resumidamente, após a desnaturação, os *primers* e a sonda se anelam aos seus alvos. Durante o passo de polimerização, a *Taq DNA polimerase* cliva e separa fisicamente a sonda repórter do *quencher*, resultando na liberação do sinal fluorescente, que é captado pelo aparelho.....33
- Figura 8.** **A)** Comparação dos valores de $2^{-\Delta\Delta CT}$ do gene *LR11* entre os grupos de jovens,

idosos saudáveis e pacientes com Doença de Alzheimer em leucócitos de sangue periférico. **B)** Quantificação Relativa (QR) do gene *LR11* em leucócitos de sangue periférico do grupo de idosos saudáveis e pacientes com Doença de Alzheimer, utilizando grupo de jovens como referência (QR=1).....39

Figura 9. **A)** Comparação dos valores de $2^{-\Delta CT}$ do gene *LR11* entre os tecidos sangue, córtex entorrinal, córtex auditivo e hipocampo no grupo de idosos saudáveis. **B)** Quantificação Relativa (QR) do gene *LR11* nas três regiões cerebrais, utilizando os leucócitos de sangue periférico como referência (QR=1) no grupo de idosos saudáveis.....41

Figura 10. **A)** Comparação dos valores de $2^{-\Delta CT}$ do gene *LR11* entre os tecidos sangue, córtex entorrinal, córtex auditivo e hipocampo no grupo de pacientes com Doença de Alzheimer. **B)** Quantificação Relativa (QR) do gene *LR11* nas três regiões cerebrais, utilizando os leucócitos de sangue periférico como referência (QR=1) no grupo de pacientes com Doença de Alzheimer.....42

Figura 11. **A)** Comparação dos valores de $2^{-\Delta CT}$ do gene *SNAP25* entre o córtex entorrinal, córtex auditivo e hipocampo no grupo de idosos saudáveis. **B)** Quantificação Relativa (QR) do gene *SNAP25* em tecido cerebral de idosos saudáveis, utilizando o córtex auditivo como referência (QR=1).....43

Figura 12. **A)** Comparação dos valores de $2^{-\Delta CT}$ do gene *SNAP25* entre o córtex entorrinal, córtex auditivo e hipocampo do grupo de pacientes com Doença de Alzheimer e de idosos saudáveis. **B)** Quantificação Relativa (QR) do gene *SNAP25* para as três regiões cerebrais no grupo de pacientes com Doença de Alzheimer, utilizando o grupo de idosos saudáveis como referência (QR=1).....44

Figura 13. **A)** Comparação dos valores de $2^{-\Delta CT}$ do gene *SIRT1* entre o córtex entorrinal, córtex auditivo e hipocampo do grupo de pacientes com Doença de Alzheimer e de idosos saudáveis. **B)** Quantificação Relativa (QR) do gene *SIRT1* para as três regiões cerebrais no grupo de pacientes com Doença de Alzheimer, utilizando o grupo de idosos saudáveis como referência (QR=1).....46

Figura 14. **A)** Comparação dos valores de $2^{-\Delta CT}$ do gene *SIRT1* entre os tecidos sangue, córtex entorrinal, córtex auditivo e hipocampo no grupo de idosos saudáveis. **B)** Quantificação Relativa (QR) do gene *SIRT1* nas três regiões cerebrais, utilizando os leucócitos de sangue periférico como referência (QR=1) no grupo de idosos

saudáveis.....48

Figura 15. **A)** Comparação dos valores de $2^{-\Delta CT}$ do gene *SIRT1* entre os tecidos sangue, córtex entorrinal, córtex auditivo e hipocampo no grupo de pacientes com Doença de Alzheimer. **B)** Quantificação Relativa (QR) do gene *SIRT1* nas três regiões cerebrais, utilizando os leucócitos de sangue periférico como referência (QR=1) no grupo de pacientes com Doença de Alzheimer.....49

Lista de Tabelas

- Tabela 1.** Caracterização das amostras de leucócitos de sangue periférico de jovens, idosos saudáveis e pacientes com Doença de Alzheimer e de tecido cerebral *post mortem* de idosos saudáveis e pacientes com Doença de Alzheimer.....30
- Tabela 2.** Resultado do teste Kruskal-Wallis comparando os valores de $2^{-\Delta CT}$ entre os grupos de jovens, idosos saudáveis e pacientes com Doença de Alzheimer em leucócitos de sangue periférico para o gene *LR11*.....39
- Tabela 3.** Resultado do teste Mann-Whitney comparando os valores de $2^{-\Delta CT}$ entre leucócitos de sangue periférico e as três regiões cerebrais no grupo de idosos saudáveis e no grupo de pacientes com Doença de Alzheimer para o gene *LR11*.....41
- Tabela 4.** Resultado do teste t de *Student* comparando os valores de $2^{-\Delta CT}$ entre as três regiões cerebrais do grupo de pacientes com Doença de Alzheimer em relação ao grupo de idosos saudáveis para o gene *SNAP25*.....44
- Tabela 5.** Resultado do teste Mann-Whitney comparando os valores de $2^{-\Delta CT}$ entre as três regiões cerebrais do grupo de pacientes com Doença de Alzheimer em relação ao grupo de idosos saudáveis para o gene *SIRT1*.....46
- Tabela 6.** Resultado do teste de Mann-Whitney comparando os valores de $2^{-\Delta CT}$ entre leucócitos de sangue periférico e as três regiões cerebrais no grupo de idosos saudáveis e no grupo de pacientes com Doença de Alzheimer para o gene *SIRT1*.....48
- Tabela 7.** Substratos de SIRT1 e seus principais efeitos em doenças associadas ao envelhecimento.....55

Lista de Unidades

g	Aceleração gravitacional
kDa	Quilodalton
mg	Miligramas
min	Minutos
mL	Mililitros
ng	Nanogramas
pb	Pares de base
s	Segundos
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
μL	Microlitros

Lista de Abreviaturas e Siglas

ACTB	β actina
ADDA	<i>Alzheimer's Disease and Related Disorders Association</i>
AP1	<i>Activator protein 1</i>
APOE	Apolipoproteína E
APP	Proteína Precursora β -Amilóide
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CDRs	Coeficientes de demência
CREB	<i>cAMP-response element binding protein</i>
C _T	<i>Cycle threshold</i>
DA	Doença de Alzheimer
DIQ	Desvio Interquartilico
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
DP	Desvio Padrão
DSM-IV	<i>IV Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders</i>
eNOS	<i>Endothelial nitric oxide synthase</i>
FOXO	<i>Forkhead transcription factor</i>
gl	Grau de liberdade
GLM	Modelo Linear Geral
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
HIF	<i>Hypoxia inducible factor</i>
hTERT	<i>Human telomerase reverse transcriptase</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IRS-2	<i>Insulin receptor substrate 2</i>
LR11	<i>Low-density lipoprotein receptor relative with 11 binding repeats</i>
LXR	<i>Liver X receptors</i>
MEEM	Mini-Exame do Estado Mental
N	Número de indivíduos
NAD ⁺	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NF- κ B	<i>Nuclear factor - kappa B</i>
NINCDS	<i>National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke</i>
PARP	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase</i>

PGC-1 α	<i>Peroxisome proliferator activated receptor γ co-activator 1α</i>
PSEN1	Presenilina 1
PSEN2	Presenilina 2
QR	Quantificação relativa
qRT-PCR	<i>Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
RC	Restrição calórica
RNA	Ácido ribonucléico
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
RNA _r	Ácido ribonucléico ribossômico
Sir2	<i>Silent information regulator 2</i>
SIRT1	<i>Sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 1 (S. cerevisiae)</i>
SNARE	<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor</i>
SNAP25	<i>Synaptosomal-associated protein, 25kDa</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SP1	<i>Specificity protein 1</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription-6</i>
TCF/LEF1	<i>T-cell factor / lymphocyte enhancer factor 1</i>
UCP-2	<i>Uncoupling protein-2</i>
β A	β -Amilóide
$\Delta\Delta C_T$	Método <i>cycle threshold</i> comparativo
♀	Sexo feminino
♂	Sexo masculino

RESUMO

Resumo

A Doença de Alzheimer é uma das causas mais comuns de demência na população idosa. Esta doença é caracterizada por um complexo processo neurodegenerativo que afeta diversos genes e proteínas. Desta forma, genes diferencialmente expressos têm sido investigados como possíveis biomarcadores para condições tais como o envelhecimento e a Doença de Alzheimer. **Objetivos:** A expressão dos genes *LR11*, *SNAP25* e *SIRT1*, envolvidos respectivamente com processamento da proteína precursora β -Amilóide, transmissão sináptica e neuroproteção, foram quantificados em tecido cerebral e sanguíneo. Além disso, também foi comparada a expressão entre estes dois tecidos a fim de identificar marcadores sistêmicos que pudessem estar correlacionados ao cérebro. **Métodos:** A quantificação de RNAm foi realizada por meio de qRT-PCR em três regiões cerebrais *post mortem* (córtices entorrinal e auditivo e hipocampo) de 10 pacientes com Doença de Alzheimer e 10 idosos saudáveis, assim como em leucócitos de sangue periférico de 25 jovens, 20 idosos saudáveis e 35 pacientes com Doença de Alzheimer. Foi utilizado o método $\Delta\Delta C_T$ e a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ foi empregada no cálculo da quantificação relativa. **Resultados:** A quantificação do RNAm de *LR11* não diferiu entre as regiões cerebrais de pacientes com Doença de Alzheimer e de idosos saudáveis. Em leucócitos, porém, sua expressão foi cerca de três vezes maior em pacientes com Doença de Alzheimer e idosos saudáveis em relação ao grupo de jovens. Em relação ao gene *SIRT1*, sua expressão foi duas vezes maior em pacientes com Doença de Alzheimer do que em idosos saudáveis para as três regiões cerebrais estudadas. Em leucócitos, por sua vez, a quantificação do RNAm de *SIRT1* não diferiu entre os três grupos estudados. Além disso, leucócitos de sangue periférico apresentaram maior expressão dos genes *LR11* e *SIRT1* quando comparados ao cérebro. Para o gene *SNAP25*, foi observada ausência de expressão em leucócitos de sangue periférico. Em relação ao tecido cerebral de idosos saudáveis, o córtex entorrinal e o hipocampo apresentaram menor expressão de *SNAP25* do que o córtex auditivo. Além disso, a quantificação relativa de *SNAP25* nas regiões cerebrais de pacientes com Doença de Alzheimer variou entre 34 e 39% do total de expressão observada em idosos saudáveis. **Conclusões:** Os resultados deste estudo indicaram alguns potenciais marcadores para o envelhecimento e para a Doença de Alzheimer. O nível de expressão de *LR11* pode ser considerado um marcador de envelhecimento em tecido sanguíneo. A maior expressão de *SIRT1* no cérebro de pacientes com Doença

de Alzheimer sugere que este gene possa estar envolvido em mecanismos compensatórios nos estágios tardios da doença. A expressão cerebral dos genes *LR11* e *SIRT1* não se correlacionou com a de leucócitos, não sendo possível utilizá-los como biomarcadores sistêmicos da doença. O gene *SNAP25* não se expressou em tecido sanguíneo na DA, desse modo, não foi indicado como biomarcador para a doença nesse tecido. No cérebro, porém, a diminuição de sua expressão em pacientes com DA sugere disfunção sináptica e de neurotransmissão associada à doença.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Estima-se que em 2050 haja, em todo o mundo, cerca de dois bilhões de habitantes com 60 anos ou mais, sendo que o Brasil deterá 64 milhões deste total (*Population Division of the Department of Economic and Social Affairs of the United Nations Secretariat*, 2009). Com o aumento da longevidade, eleva-se também a incidência de demências, sendo a Doença de Alzheimer (DA) o tipo mais comum dentre elas (Hung et al, 2010).

A DA é uma doença neurodegenerativa progressiva que afeta preferencialmente indivíduos acima dos 60 anos de idade, com grande aumento do risco em idades mais avançadas (Papassotiropoulos et al, 2006). Além disso, tendências mostram que a incidência da doença é crescente principalmente em países em desenvolvimento, dado o envelhecimento da população (Grossman et al, 2010).

Estudos demonstraram que a DA resulta em perda irreversível de neurônios, principalmente no córtex e no hipocampo. Seus aspectos clínicos envolvem prejuízo progressivo da memória, julgamento, tomada de decisões, orientação temporo-espacial e linguagem. O diagnóstico provável é baseado no exame neurológico e na exclusão de outros casos de demência, porém o diagnóstico definitivo pode ser feito somente por meio de avaliação *post mortem* do cérebro. Patologicamente, ela é caracterizada por perda neuronal, placas senis contendo o peptídeo β -Amilóide (β A) e emaranhados neurofibrilares, compostos pela proteína tau hiperfosforilada (Nussbaum, Ellis, 2003).

A classificação usualmente empregada para a DA refere-se à forma familiar ou esporádica. A forma familiar possui uma herança autossômica dominante com idade de acometimento abaixo de 65 anos e foi relacionada a mutações nos genes da proteína precursora β A (*APP*), presenilina 1 (*PSEN1*) e presenilina 2 (*PSEN2*). Por outro lado, o alelo *APOE*4* do gene da apolipoproteína E (*APOE*) é o maior fator de risco associado à forma esporádica da doença e deve atuar junto com outros genes de suscetibilidade, em uma complexa interação com fatores ambientais (Blennow et al, 2006).

Durante a progressão da DA, observa-se intensa perda de qualidade de vida e produtividade, além de gastos médicos excessivos. Desta forma, é preciso buscar terapias efetivas para prevenir ou retardar a idade de acometimento da doença (Grossman et al, 2010).

Para a realização de um diagnóstico mais precoce da doença investiga-se a presença de biomarcadores que promovam a redução nos gastos com diagnóstico clínico e que indiquem o momento da intervenção terapêutica, antes do processo de neurodegeneração (Rezai-Zadeh et al, 2009).

Diversos estudos investigaram genes diferencialmente expressos em condições como a DA. A compreensão das alterações metabólicas que ocorrem durante o curso da doença poderia auxiliar no desenvolvimento de novos alvos terapêuticos e de estratégias mais eficientes de tratamento (Papassotiropoulos et al, 2006).

Neste sentido, o presente estudo propôs a análise da expressão dos genes *LR11*, *SNAP25* e *SIRT1*, selecionados de acordo com suas funções e/ou seus envolvimento em processos relacionados ao envelhecimento e à DA, buscando melhorar a compreensão da fisiopatologia da doença e identificar possíveis marcadores para o envelhecimento e para a DA.

1.1 Objetivos

1. Avaliar se há diferença de expressão dos genes *LR11*, *SNAP25* e *SIRT1* em leucócitos de sangue periférico de jovens, idosos saudáveis e pacientes com DA;
 2. Avaliar a expressão destes genes em tecido cerebral *post mortem* (córtices entorrinal e auditivo e hipocampo) de um grupo de idosos saudáveis e de pacientes com DA, a fim de verificar se há diferenças de expressão entre as três regiões analisadas dentro de cada grupo e entre os grupos estudados;
 3. Comparar os níveis de expressão entre leucócitos de sangue periférico e tecido cerebral, a fim de buscar marcadores sistêmicos da doença;
-

4. Identificar marcadores genéticos que poderão potencialmente subsidiar o diagnóstico e permitir melhor entendimento da patogênese da doença.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Envelhecimento

O envelhecimento é um processo multifatorial, complexo e irreversível. Suas características mais proeminentes são a diminuição progressiva na capacidade fisiológica, a capacidade reduzida de responder adaptativamente aos estímulos do meio ambiente, aumento na suscetibilidade a doenças e aumento na mortalidade (Farooqui, Farooqui, 2009).

Inúmeras teorias foram propostas na tentativa de explicar o envelhecimento e dentre as principais hipóteses encontram-se: alterações nas proteínas, danos ao DNA e menor eficiência no seu reparo, ligações cruzadas (*cross-linking*) inapropriadas de proteínas, DNA e outras moléculas estruturais, falha na secreção neuroendócrina, senescência celular, aumento do estresse oxidativo e alterações na expressão gênica (Farooqui, Farooqui, 2009).

Estima-se que em 2050 haja, em todo o planeta, cerca de dois bilhões de habitantes com 60 anos ou mais (*Population Division of the Department of Economic and Social Affairs of the United Nations Secretariat, 2009*). No Brasil, dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) de 2009 indicam que no período de 2000 a 2020 o grupo etário de 60 anos ou mais duplicará, passando de 13,9 para 28,3 milhões e, posteriormente, elevando-se para 64 milhões em 2050. De acordo com as projeções, em 2030, o número de idosos irá superar em quase quatro milhões a faixa etária que possui idade abaixo de 15 anos e essa diferença aumentará para 35,8 milhões em 2050 (Figura 1). Nesse ano, os idosos representarão 28,8% do total da população brasileira. As futuras pirâmides etárias apresentarão diminuições sucessivas de contingentes na sua base e aumentos sucessivos nas idades posteriores, até atingir a forma de uma estrutura piramidal estável, em que praticamente todos os grupos etários seriam de igual magnitude (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2009).

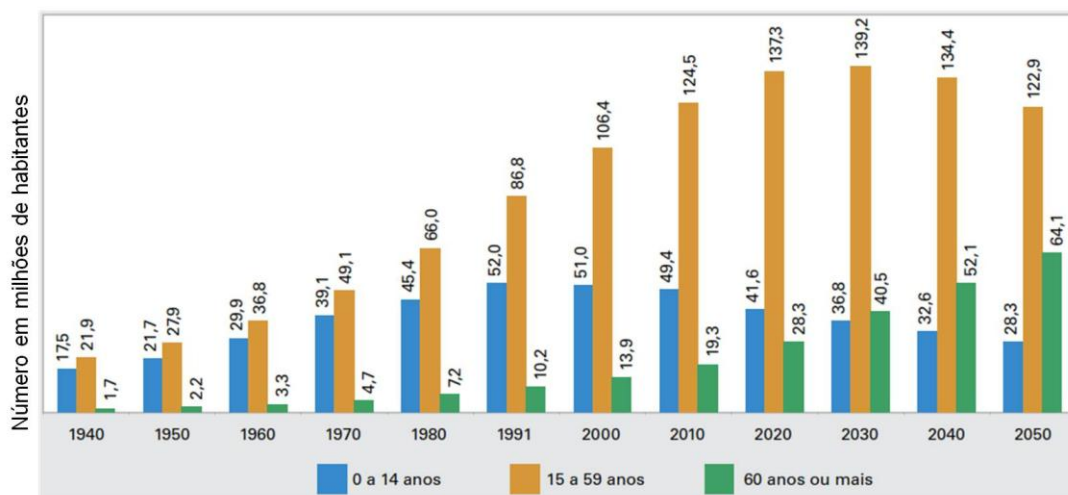


Figura 1: População (em milhões de habitantes) de crianças (0 a 14 anos), jovens e adultos (15 a 59 anos) e idosos (60 anos ou mais) no Brasil, estimada para o período de 1940 a 2050. Adaptado de Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2009.

Os avanços na biologia molecular permitiram melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no envelhecimento, além de identificar vias de sinalização envolvidas na regulação da longevidade, tais como funções mitocondriais, sirtuínas e restrição calórica (RC). Alterações nos mecanismos moleculares do envelhecimento podem contribuir para a patogênese de doenças neurodegenerativas, como por exemplo, as demências (Hung et al, 2010).

Na América Latina, muitos países estão passando por um processo de transição demográfica, no qual os idosos representam uma proporção significativa do total da população. Uma consequência natural dessa rápida transformação, concomitante com as baixas taxas de níveis socioeconômicos e educacionais, é o aumento da prevalência de condições como a demência, que vem se tornando um grande problema de saúde pública nessas regiões (Nitrini et al, 2009).

Demência é definida como uma síndrome que inclui déficit de memória e distúrbios em outras funções corticais comumente acompanhados e/ou precedidos por deterioração do controle emocional e comportamento social. Observa-se um grave declínio cognitivo que interfere nas funções diárias, sendo que o diagnóstico frequentemente ocorre muito tempo após o início dos sintomas iniciais. A necessidade por assistência médica e serviços sociais devido ao crescente número de indivíduos

com demência leva a consequências graves para países em desenvolvimento (Fratiglioni, Qiu, 2009).

Levando-se em consideração as tendências do envelhecimento populacional, projeta-se que o número de pessoas com demência irá dobrar a cada 20 anos e essa taxa de aumento será de três a quatro vezes maior em áreas em desenvolvimento em relação às áreas desenvolvidas (Figura 2) (Fratiglioni, Qiu, 2009).

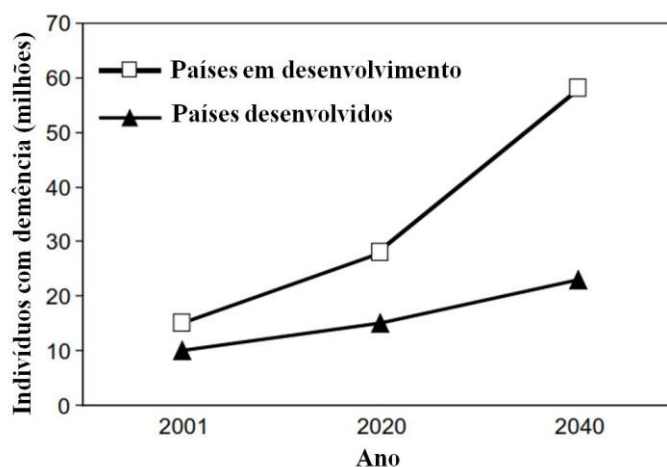


Figura 2: Número estimado (em milhões) de indivíduos com demência após os 60 anos de idade em países desenvolvidos e em países em desenvolvimento no ano 2001, com projeções para os anos 2020 e 2040. Modificado de Fratiglioni, Qiu, 2009.

O risco para demência pode ser resultado de uma complexa interação entre suscetibilidade genética e fatores biológicos e ambientais aos quais o indivíduo foi exposto durante a vida. Ela representa um grande impacto na vida das pessoas e na sociedade, além de aumentar o risco de mortalidade (Fratiglioni, Qiu, 2009).

A DA é o tipo mais comum de demência, representando de 50 a 60% de todos os casos, sendo o envelhecimento o maior fator de risco para esse distúrbio (Blennow et al, 2006).

2.2 Doença de Alzheimer

2.2.1 Características Gerais

A DA foi descrita pela primeira vez em 1907 pelo neuropsiquiatra Alois Alzheimer, que descreveu a formação de placas senis e emaranhados neurofibrilares em autópsia do córtex cerebral de uma paciente com demência. Ainda hoje, esses são os principais sinais que caracterizam a doença (Gauthier, 2002).

A DA é uma doença neurodegenerativa que afeta preferencialmente indivíduos acima dos 60 anos de idade, com aumento crescente do risco em idades mais avançadas. Ela é caracterizada pela progressiva deterioração da memória e de outros domínios cognitivos. Com a progressão da doença, outros sintomas tais como delírio, agitação, mudanças de personalidade e distúrbios de humor também podem se manifestar (Papassotiropoulos et al, 2006).

Cerca de 5% dos indivíduos com 65 anos ou mais manifestam essa doença e a prevalência aumenta para 19% após os 75 anos e para 30% após os 85 anos (Lambert, Amouyel, 2007). A menos que se desenvolvam terapias efetivas para prevenção, estima-se que em 2050 mais de 107 milhões de pessoas em todo o mundo sofrerão de DA. Além da perda da qualidade de vida e produtividade, essa doença também representa um elevado custo em saúde (Grossman et al, 2010).

No Brasil, a estatística é muito semelhante à mundial. Herrera e colaboradores (1998) observaram prevalência de 7,1% de casos de demência em indivíduos com idade igual ou acima de 65 anos, sendo que 55,1% dos casos de demência receberam o diagnóstico de DA. A partir dos 65 anos, a prevalência de DA dobra a cada cinco anos (Figura 3) (Herrera Jr et al, 1998).

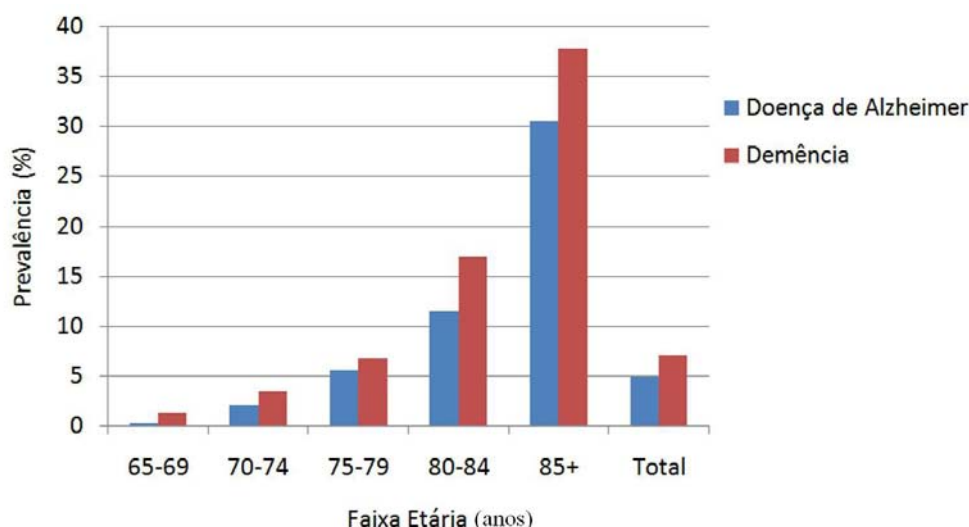


Figura 3: Prevalência de demência e Doença de Alzheimer em função da idade em uma população brasileira. Adaptado de Herrera Jr et al, 1998.

A DA é uma doença multifatorial e geneticamente complexa. Muitos fatores podem influenciar no risco de desenvolvimento, modificar a idade de acometimento e o curso da doença. Esses fatores podem ser genéticos (mutações causais, alelos de risco ou de proteção), sociodemográficos (nível de educação, inteligência), estilo de vida (aspectos de nutrição, exercício aeróbico e mental), ambiental (trauma craniano), clínico (comorbidades) e farmacológico (antiinflamatórios não esteróides, estatinas) (Papassotiropoulos et al, 2006). Outros fatores de risco associados incluem doença vascular, hipercolesterolemia, hipertensão, aterosclerose, doença coronariana, tabaco, obesidade e diabetes (Blennow et al, 2006).

A DA é uma doença heterogênea, classificada em geral como familiar ou de acometimento precoce e não-familiar ou esporádica de acometimento tardio. Embora fatores ambientais aumentem o risco para a doença, também existe um significativo *background* genético, uma vez que estudos em gêmeos mostraram uma herdabilidade ao redor de 80% (Blennow et al, 2006).

2.2.2 Aspectos Clínicos e Neuropatológicos

Foram descritos três estágios para a DA – leve, moderado e grave – com declínios funcional e cognitivo que duram de 5 a 8 anos e tendem a ser lineares durante os três estágios da doença. No estágio inicial (leve), que normalmente dura de

2 a 3 anos, o paciente apresenta prejuízo na memória de curto prazo que frequentemente é acompanhado por sintomas de ansiedade e depressão. Durante o estágio moderado, ocorrem manifestações neuropsiquiátricas como alucinações visuais, crenças falsas e alteração no padrão de sono. O estágio final, mais grave é caracterizado por sinais motores como rigidez, declínio cognitivo proeminente e vida puramente vegetativa (Gauthier, 2002).

A doença possui duas características neuropatológicas marcantes: as placas senis (ou neuríticas) e os emaranhados (ou novelos) neurofibrilares (Figura 4), além de apresentar também perda neuronal e de conexões sinápticas, sendo todos estes eventos relacionados (Huang, Jiang, 2009). As placas senis e os emaranhados neurofibrilares são ambos causas e indicações de um mau funcionamento neuronal, que resulta em perda sináptica, a qual explica os danos na memória e a demência progressiva, sintomas clínicos clássicos da DA (Herz, Beffert, 2000).

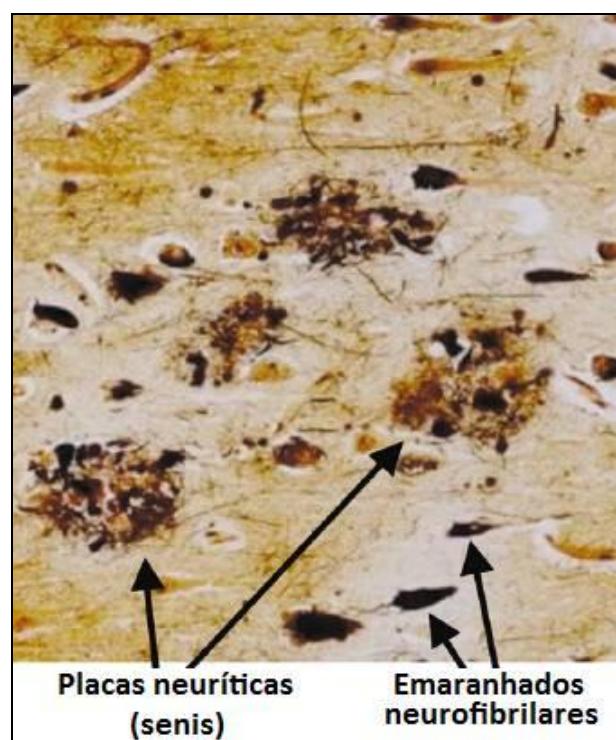


Figura 4: Placas neuríticas ou senis e emaranhados neurofibrilares no córtex cerebral de pacientes com Doença de Alzheimer. Modificado de Blennow et al, 2006.

O componente dominante do núcleo da placa senil é o peptídeo βA , produto da clivagem de uma proteína bem maior, APP, por uma série de proteases, as

α , β e γ secretases (Nussbaum, Ellis, 2003). A APP é uma proteína transmembrânica e sua clivagem fisiológica resulta na secreção de um domínio extracelular. Foi descrito que a APP secretada aumenta a sobrevivência e adesão celular e previne o acúmulo de cálcio intracelular e a morte dos neurônios (Gustaw-Rothenberg et al, 2010).

O processamento normal de APP envolve sua clivagem predominantemente pela α secretase, que cliva APP no meio da sequência β A, evitando a formação do peptídeo β A. No cérebro normal, 10% dos peptídeos β A estão sob a forma β A₄₂ fibrilogênica e neurotóxica e os outros 90% estão sob a forma de β A₄₀ menos tóxica (Chapman et al, 2001).

Dentre os produtos finais da clivagem de APP (pelas β e γ secretases) encontram-se as variantes do peptídeo β A que tendem a se agregar (Gustaw-Rothenberg et al, 2010). As γ secretases, em particular, parecem ser responsáveis por gerar o peptídeo β A₄₂, que forma fibras insolúveis que se acumulam nas placas senis em cérebro de pacientes com DA (Nussbaum, Ellis, 2003). Essas placas são tóxicas para a membrana celular e iniciam um processo inflamatório de células gliais, causando danos aos neurônios (Gustaw-Rothenberg et al, 2010).

Possíveis mecanismos foram sugeridos na tentativa de explicar a toxicidade causada pela proteína β A extracelular, como vulnerabilidade das células a danos secundários, alterações no influxo de cálcio, ativação do processo inflamatório, colapso de microtúbulos, hiperfosforilação da tau, indução de apoptose, indução da atividade de proteases lisossomais e dano direto à membrana, além da depleção de APP pré-sináptica, que resulta em perda da transmissão sináptica (Li et al, 2007; Gustaw-Rothenberg et al, 2010).

Os peptídeos β A são produtos da proteólise normal de APP e existem mecanismos para manter a quantidade de β A gerada equivalente à de β A metabolizada. Uma metabolização deficiente de β A neuronal é observada na forma esporádica da DA (90% de todos os casos de DA) e os peptídeos β A se acumulam e formam as placas senis nos neurônios, aumentando o risco de neurotoxicidade. Os peptídeos β A cerebrais não são metabolizados somente pela via proteolítica, mas também após transporte para o sangue, onde serão removidos pelo fígado ou rim (Huang, Jiang, 2009).

Por outro lado, os emaranhados neurofibrilares são constituídos principalmente pela proteína tau associada aos microtúbulos. Nos neurônios, tau liga e estabiliza os microtúbulos, regula o transporte axonal, é solúvel e tem a tendência de se agregar em condições fisiológicas. Na DA, ela dissocia-se dos microtúbulos e agrega-se formando fibras insolúveis no cérebro (Huang, Jiang, 2009).

Na DA, tau apresenta-se fosforilada, com grupamentos fosfato ligados a sítios específicos da molécula. Ela pode ser fosforilada em até 30 posições, sendo o grau de fosforilação dependente da atividade de quinases e fosfatases. Desta forma, a hiperfosforilação da tau pode estar associada a *upregulation* de quinases e a diminuição de fosfatases no cérebro de pacientes com DA. Alterações na homeostase do cálcio neuronal levam à hiperfosforilação da tau, que induz à perda da capacidade de se ligar aos microtúbulos e consequente apoptose neuronal. Outras proteínas também se associam com os emaranhados, como ubiquitina e colinesterases, porém a tau é o componente crítico da maioria dessas estruturas (Huang, Jiang, 2009).

A extensão e distribuição dos emaranhados em casos de DA estão correlacionados ao grau de demência e duração da doença, sugerindo que essas alterações possuam impacto direto na funcionalidade do cérebro. No entanto, também é importante ressaltar que, embora os emaranhados sejam uma das principais características histopatológicas da DA, ela também pode ser encontrada em outras doenças e em idosos saudáveis (Huang, Jiang, 2009).

Tanto as placas senis quanto os emaranhados neurofibrilares envolvem o acúmulo de proteínas anormais e deram origem a duas hipóteses: a hipótese amilóide e a hipótese tau (Figura 5). Em ambos os casos a presença de material insolúvel interfere na função neuronal normal. As duas diferem em relação à natureza da proteína, a localização celular e a presença de mutações gênicas que causam a DA (Chapman et al, 2001).

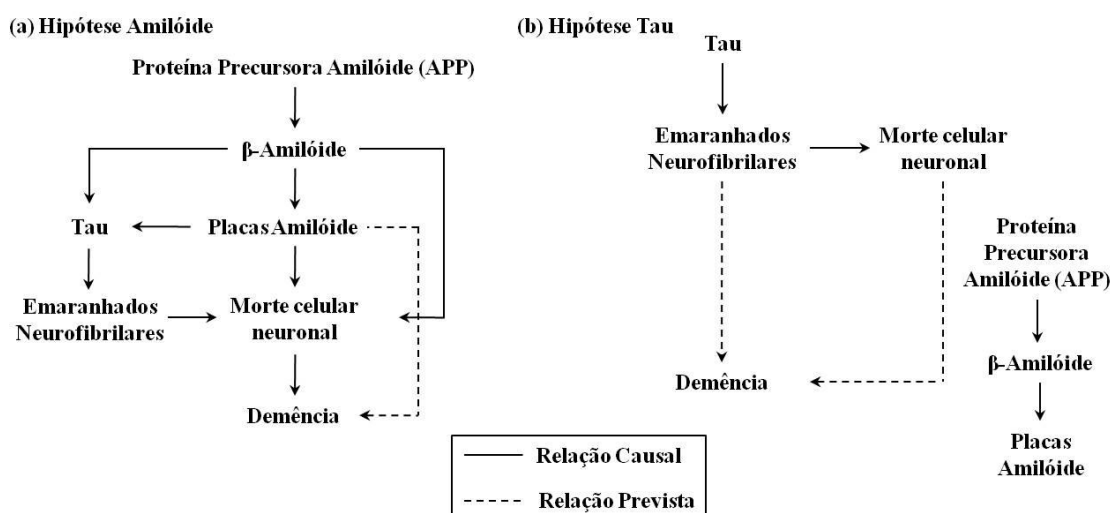


Figura 5: Hipótese amilóide *versus* hipótese tau. **(a)** De acordo com a hipótese amilóide, o processamento patológico da Proteína Precursora β -Amilóide leva ao aumento da proteína β -Amilóide no cérebro e à formação das placas senis. As placas e/ou peptídeos β -Amilóide podem levar à morte neuronal. Sugere-se que a patologia da tau é secundária a patologia amilóide e ambas levam à morte celular. A perda cognitiva, e consequentemente a demência, ocorrem como resultado da formação das placas senis, da perda neuronal, do efeito direto de β -Amilóide ou da combinação desses. **(b)** A hipótese tau enfatiza o papel da tau e dos emaranhados neurofibrilares como responsáveis pela perda celular e demência. Ela também reconhece a via amilóide, mas enfatiza que ambas são independentes. Modificado de Chapman et al, 2001.

Além disso, uma série de alterações em estruturas anatômicas também ocorre durante o curso da doença. É possível observar significativa atrofia de algumas regiões cerebrais, particularmente da formação hipocampal e do córtex entorrinal, observadas em estágios precoces da doença. A taxa de atrofia no hipocampo varia entre 3 e 7% ao ano em pacientes com DA, enquanto que em controles saudáveis é de no máximo 0,9% (Hampel et al, 2008). Sugere-se que o córtex entorrinal seja alvo precoce da DA e pode ser a região de onde a doença se dissemina para outras áreas cerebrais, propagando-se através do circuito entorrinal-hipocampal. Uma vez que as várias formas de memória dependem dessas vias intactas, é esperado que elas estejam gravemente afetadas na DA (Harris et al, 2010).

Os emaranhados neurofibrilares são encontrados primeiramente no córtex entorrinal na DA leve e distribuem-se para o hipocampo e outras áreas corticais durante a progressão da doença. Além disso, o aumento da produção de β A/APP em modelos transgênicos de camundongos que superexpressam uma forma mutante de

APP no córtex entorrinal, resultou em alterações cognitivas e comportamentais, incluindo hiperatividade, desinibição e déficits no aprendizado e na memória. No mesmo sentido, esses animais apresentaram deficiência na transmissão sináptica que pode ser responsável por iniciar as disfunções observadas nas vias córtico-hipocampais tanto em modelos animais quanto em pacientes com DA (Harris et al, 2010).

No final da década de 70, foi descrito que o cérebro de pacientes com DA era deficiente em acetilcolina, um dos principais neurotransmissores do Sistema Nervoso Central (SNC), que facilita a aprendizagem e melhora a atenção. A descoberta levou ao desenvolvimento da hipótese colinérgica, que estabelece que a disfunção cognitiva, funcional e comportamental associada a DA pode ser causada pela incapacidade de transmissão dos impulsos neurológicos através de sinapses colinérgicas. Hoje, o principal tratamento sintomático da doença é baseado no reforço farmacológico de vias colinérgicas (Gauthier, 2002).

2.2.3 Aspectos Genéticos

Mais de 160 mutações em três *loci* genéticos foram identificadas como sendo responsáveis pela forma familiar da DA, que possui herança autossômica dominante e idade de acometimento abaixo de 65 anos de idade (Gustaw-Rothenberg et al, 2010). Os genes descritos foram o gene *PSEN1*, localizado no cromossomo 14 (Sherrington et al, 1995), *PSEN2*, localizado no cromossomo 1 (Levy-Lahad et al, 1995) e o gene *APP*, localizado no cromossomo 21 (Goate et al, 1991). Porém, a forma familiar da doença é rara, com prevalência menor que 1-2% dos casos (Gustaw-Rothenberg et al, 2010).

Em 1991, foi descrita a primeira mutação em *APP* e, subsequentemente, novas mutações foram descritas e relacionadas à forma familiar da DA. A identificação dessas mutações levou à melhor compreensão das cascatas metabólicas que ocasionam o aumento da produção do peptídeo β A e deu origem à hipótese amilóide. No entanto, uma pequena porcentagem da forma familiar da DA era explicada pelas mutações em *APP* e posteriores estudos de ligação levaram a identificação de uma família de genes que também poderia estar envolvida: os genes das presenilinas (Papassotiropoulos et al, 2006).

Os genes *PSEN1* e *PSEN2* codificam proteínas transmembrânicas de 467 e 448 aminoácidos, respectivamente, que são expressas no cérebro e em outros tecidos do corpo humano. Ambas as presenilinas são subunidades da γ secretase, que cliva APP dentro de seu domínio transmembrânico e gera peptídeos β A que se acumulam no cérebro de pacientes com DA (Pleckaityte, 2010). Mutações em *APP* ou nos genes de presenilinas podem alterar os sítios de clivagem a favor das γ secretases e favorecer a produção de β A₄₂, amiloidogênico e tóxico, em relação à forma menos tóxica β A₄₀ (Nussbaum, Ellis, 2003).

Localizado no cromossomo 19, o gene *APOE* codifica a apolipoproteína E, que possui importante papel na regulação do metabolismo do colesterol e triglicérides e está intimamente associada à forma esporádica da DA. Existem três alelos comuns para *APOE*, conhecidos como *APOE*2*, *APOE*3* e *APOE*4*. Cada pessoa possui uma combinação desses três alelos, resultando nos genótipos *APOE*2/2*, *APOE*2/3*, *APOE*2/4*, *APOE*3/3*, *APOE*3/4* e *APOE*4/4*. Em relação ao genótipo mais comum *APOE*3/3*, a presença do alelo *APOE*2* está associado a um menor risco para a DA, enquanto que a presença do alelo *APOE*4* está associado a um aumento desse risco (Papassotiropoulos et al, 2006).

Os alelos distinguem-se uns dos outros com base em dois polimorfismos de base única, que resultam em mudanças de aminoácidos nas posições 112 e 158. O alelo *APOE*2* possui uma cisteína nas posições 112 e 158, o alelo *APOE*3* uma cisteína na posição 112 e uma arginina na 158 e o alelo *APOE*4* possui arginina em ambas as posições. A associação do alelo *APOE*4* com a DA foi inicialmente observada em 1993 por Corder e colaboradores e posteriormente replicada e comprovada em diversos estudos, sendo hoje o fator de risco genético mais bem estabelecido para a doença (Corder et al, 1993; Papassotiropoulos et al, 2006).

Além disso, foi descrito que *APOE* exacerba diversos aspectos bioquímicos característicos da cascata patológica da doença, tais como deposição de β A, formação de emaranhados neurofibrilares, neurodegeneração, perda da plasticidade neuronal, disfunção colinérgica, lipídica e na sinalização (Cedazo-Minguez, 2007).

Nas últimas décadas, inúmeros trabalhos identificaram mais de 500 genes candidatos como fatores de risco para a DA. Porém, com exceção do alelo *APOE*4* do gene *APOE*, nenhum desses provou influenciar consistentemente no risco para a doença ou modificar a idade de acometimento (Bertram, Tanzi, 2008).

Embora existam causas genéticas diferentes para a DA, os danos cognitivos e as lesões patológicas observadas no cérebro dos pacientes são semelhantes, sugerindo que há uma via patológica final comum, porém com características distintas (Figura 6) (Chapman et al, 2001; Jellinger et al, 2008).

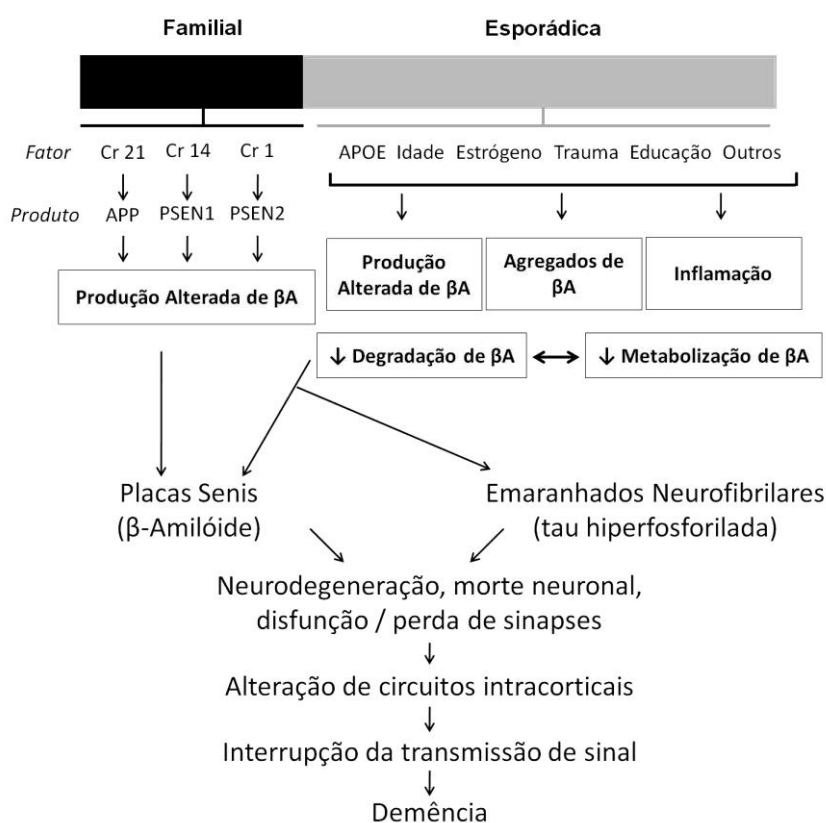


Figura 6: Fatores associados à forma familiar e esporádica da Doença de Alzheimer e as vias patogênicas fundamentais relacionadas à doença. Cr: Cromossomo; β A: β -Amilóide; APP: proteína precursora β A; PSEN1: presenilina 1; PSEN2: presenilina 2; APOE: apolipoproteína E. Modificado de Jellinger et al, 2008.

2.2.4 Expressão gênica como ferramenta para descoberta de biomarcadores para a Doença de Alzheimer

O diagnóstico clínico para a DA normalmente é feito posteriormente ao surgimento dos sintomas cognitivos e a intervenção terapêutica ocorre após significativa neurodegeneração. Além disso, o diagnóstico definitivo “padrão-ouro” pode somente ser determinado através de análises neuropatológicas *post mortem*. Desta forma, a descoberta de marcadores biológicos sensíveis permitiria um diagnóstico clínico precoce, além de intervenção terapêutica mais efetiva (Rezai-Zadeh et al, 2009).

Marcadores biológicos – biomarcadores – são indicadores biológicos de doença ou de efeitos terapêuticos, que podem ser dosados por meio de testes no sangue (e outras amostras biológicas) ou testes de imagem (Scherzer, 2009).

Flúidos corporais, como sangue, urina, saliva e líquido cefalorraquidiano têm sido utilizados na descoberta de biomarcadores de expressão gênica para doenças neurológicas. Além disso, células não-neuronais e tecidos, como fibroblastos, leucócitos e biópsia de músculo também têm sido avaliados. Essas análises são baseadas na premissa de que fluídos biológicos e células não-neuronais podem servir como substratos de processos patobiológicos e farmacológicos no cérebro (Scherzer, 2009).

Para melhor detecção precoce dos diferentes tipos de demência, buscam-se testes diagnósticos não invasivos e acessíveis. A estrutura da barreira hematoencefálica limita a presença de biomarcadores periféricos que possam estar associados a doenças cerebrais tais como moléculas pequenas, lipofílicas e que dependem de transportadores específicos. Uma alternativa é a análise do perfil transcricional de genes no tecido sanguíneo periférico, que é capaz de prever mudanças mais precocemente do que alterações protéicas (Cedazo-Minguez, Winblad, 2010).

Uma hipótese sugerida para explicar como um transcrito do sangue pode agir como marcador de uma doença cerebral é que a doença envolve processos que resultam em alterações sistêmicas da expressão gênica, que podem ser detectadas no sangue, embora a manifestação da disfunção ocorra somente no cérebro (Thambisetty,

Lovestone, 2010). Desta forma, os componentes sanguíneos podem nos fornecer “janelas” para o SNC no que diz respeito a etiopatogenia de doenças neurológicas como a DA, uma vez que as alterações não se originam somente de sinais oriundos do SNC, mas deixa também pistas periféricas (Maes et al, 2009).

Análises do perfil de expressão de células mononucleares sanguíneas podem nos oferecer vantagens em decifrar padrões aberrantes de regulação gênica na DA, porque: (1) essas células são prontamente adquiridas por uma simples punção venosa, (2) o SNC se comunica com o sistema imune através de diversos mecanismos moleculares, hormonais e de neurotransmissão, (3) expressão anormal de APP, níveis alterados de enzimas antioxidantes, danos oxidativos ao DNA, RNA e proteínas, secreção desregulada de citocinas e taxas elevadas de apoptose são características em comum entre cérebro e linfócitos de pacientes com DA (Maes et al, 2007).

Neste sentido, alguns estudos buscaram acessar o perfil transcricional de linfócitos de pacientes com DA e de controles saudáveis, com a finalidade de investigar diferenças na expressão gênica e de identificar novos marcadores para a doença. Porém, muitos dos genes diferencialmente expressos não foram posteriormente validados (Kalman et al, 2005; Maes et al, 2007; Maes et al, 2009).

Essa busca por biomarcadores candidatos através da análise da expressão gênica em doenças neurológicas é um processo trabalhoso e difícil, mas essencial. A maioria dos estudos de expressão gênica publicados em doenças neurodegenerativas ainda envolvem um número amostral pequeno e não possuem poder suficiente para identificar resultados positivos verdadeiros com efeitos pequenos (Scherzer, 2009).

2.2.5 Genes potencialmente relevantes para a Doença de Alzheimer

Foram investigados três genes, *LR11*, *SNAP25* e *SIRT1*, potencialmente relevantes à etiopatogenia da DA, selecionados através da análise de estudos de proteômica e *microarray* (Greber et al, 1999; Scherzer et al, 2004). A seguir, encontra-se uma breve descrição dos genes escolhidos, os quais possuem importante participação em funções como transporte e processamento de APP/amiloidogênese, transmissão sináptica e neuroproteção relevantes à DA.

2.2.5.1 Gene *LR11* (low-density lipoprotein receptor relative with 11 binding repeats)

O gene *LR11* (também conhecido como *SORL1* ou *SorLA*), localiza-se no cromossomo 11q23.2-q24.2 e codifica uma proteína que é membro de uma família de receptores de lipoproteína de baixa densidade, que se liga a APOE (Dodson et al, 2006). A APOE é a principal apolipoproteína expressa no cérebro e o alelo *APOE*4* é o fator de risco genético mais relevante para os casos esporádicos da doença (Corder et al, 1993).

Esse receptor é encontrado predominantemente no cérebro, mas também é expresso em tecidos não-neuronais como testículos, ovários, linfonodos, rins e linfoblastos (Jacobsen et al, 2002; Scherzer et al, 2004; Fiete et al, 2007).

LR11 possui domínios funcionais adicionais e atua em diversas funções fisiológicas, incluindo transporte de íons, atividade semelhante à chaperonas, sinalização e distribuição intracelular (Dodson et al, 2006).

Além disso, *LR11* é um fator de risco genético candidato para a DA de acometimento tardio, uma vez que a redução na expressão de sua proteína foi observada somente em cérebro de pacientes com DA esporádica e não familiar (Dodson et al, 2006). Isso sugere que a perda de *LR11* não ocorre secundariamente às alterações patológicas, mas talvez ocorra em estágios precoces da doença, mesmo antes da confirmação do diagnóstico (Ma et al, 2009).

Em estudos de *microarray*, *LR11* apresentou menor expressão em linfoblastos de dois grupos independentes de pacientes com DA quando comparado a indivíduos controles. Na análise subsequente, em tecido cerebral, também foi detectada redução dos níveis protéicos de *LR11* em pacientes com DA quando comparado aos controles, sendo que a maioria dos pacientes encontrava-se em estágios tardios da doença. Foi observado que a diminuição da expressão do gene não ocorreu devido à perda celular, uma vez que os neurônios encontravam-se saudáveis e com a expressão preservada na glia (Scherzer et al, 2004).

Ao analisar o padrão de expressão de *LR11* em diferentes regiões cerebrais, observou-se que a formação hipocampal e o córtex frontal, duas regiões

fortemente afetadas na patogênese da DA, demonstraram uma relativa perda de expressão do receptor LR11. Por outro lado, o cerebelo e os gânglios da base, duas outras regiões menos afetadas pela doença, não apresentaram alteração de expressão gênica. Esses resultados sugerem que a redução de LR11 possui importante papel na patogênese dessa doença (Offe et al, 2006).

A proteína LR11 pode ser detectada também no líquido cefalorraquidiano, sendo que seus níveis estão significativamente reduzidos em pacientes com DA leve a moderada quando comparados aos controles. Essa redução foi também confirmada em amostras de líquido cefalorraquidiano *post mortem* e foi correlacionada com níveis de APP solúvel, mas não com níveis de APOE (Ma et al, 2009).

LR11 interage com APP e ambas as proteínas colocalizam-se nos compartimentos endossomais e no complexo de Golgi. Estudos *in vitro*, em células vivas, modelos de camundongos *knockout* e pacientes com DA apoiam a idéia de que o aumento dos níveis de receptor LR11 coincide com controle do processamento de APP e leva a uma redução de β A. Por outro lado a perda da sua função leva ao processamento de APP, promove uma produção acelerada de β A e formação de placas senis, podendo ser um importante fator de risco para a DA (Andersen et al, 2005).

Sugere-se que LR11 atue como receptor de APP, determinando o transporte desse precursor para vias menos adequadas para seu processamento. Ele confina APP no complexo de Golgi, o principal local de concentração de APP na célula, e impede a transição para a superfície celular. O processamento de APP pelas α e β secretases está intimamente associado aos compartimentos posteriores ao complexo de Golgi e necessita de transição eficiente do precursor por essa organela. Ao impedir essa transição ocorre um bloqueio no seu processamento (Andersen et al, 2005).

LR11 provavelmente protege o cérebro contra a amiloidogênese e, conseqüentemente, a sua perda exacerba a amiloidose e potencializa eventos precoces no processo da doença (Dodson et al, 2006). Neste sentido, estudos são necessários a fim de investigar o potencial papel de LR11 na patogênese da DA, buscando evidências que o caracterize como um possível biomarcador para intervenção terapêutica.

2.2.5.2 Gene *SNAP25* (*synaptosomal-associated protein, 25kDa*)

SNAP25 é uma proteína codificada pelo gene *SNAP25*, localizado no cromossomo 20p11.2. Essa proteína está localizada primariamente na membrana pré-sináptica e parece estar presente na maioria das sinapses. Ele faz parte de um complexo SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor*) de proteínas, vitais para a neurotransmissão sináptica e vias de tráfego intracelulares (Minger et al, 2001; Cai et al, 2008).

O terminal pré-sináptico é um local de muitos processos especializados, essencial para as funções gerais do SNC e possui implicações na especialização de conexões sinápticas. Desta forma, a caracterização dos componentes que o constitui é fundamental para a compreensão do funcionamento neuronal ao nível molecular (Oyler et al, 1989).

A concentração de SNAP25 nos nervos terminais sugere que esta proteína participe do ancoramento e/ou fusão de vesículas sinápticas com a membrana plasmática, processo essencial para a exocitose das mesmas (Greber et al, 1999). Esta proteína é heterogeneamente expressa em diferentes populações neuronais, tanto em neurônios inibitórios quanto excitatórios, correlacionando-se a vias de transmissão específicas (Garbelli et al, 2008).

Durante o desenvolvimento, sua expressão está relacionada à sinaptogênese e a maturação neuronal. Além disso, SNAP25 possui papel na regulação da homeostase do cálcio neuronal (Garbelli et al, 2008).

Sua região promotora possui muitos sítios de ligação de fatores de transcrição, tais como SP1 (*specificity protein 1*), HIF (*hypoxia inducible factor*), CREB (*cAMP-response element binding protein*), TCF/LEF1 (*T-cell factor/ lymphocyte enhancer factor 1*), YY1F, AP1 (*activator protein 1*) e STAT (*signal transducer and activator of transcription-6*), indicando que sua expressão é altamente regulada ao nível transcricional. Além disso, a região promotora deste gene é rica em CG e não contém TATA ou CATA boxes, diferentemente dos promotores de genes da maioria dos eucariotos (Cai et al, 2008).

SNAP25 tem sido relacionada à patogênese de doenças neuropsiquiátricas como a DA e, portanto, a regulação da sua expressão pode ter importância no desenvolvimento destas. Porém, poucos estudos foram realizados na intenção de examinar os mecanismos da transcrição deste gene e seu papel na patogênese dessas doenças (Cai et al, 2008).

Estudos demonstraram que o declínio cognitivo observado na DA é causado, em grande parte, pela perda da capacidade sináptica no córtex dos pacientes (Shimohama et al, 1997). Durante a evolução da DA, observa-se degeneração dos neurônios em regiões cerebrais específicas, especialmente na região hipocampal, importante para o processo de aprendizagem e memória, e no córtex entorrinal (Sze et al, 2000). Deste modo, na DA, alterações em SNAP25 podem representar marcadores precoces de perda neuronal e parecem ter importante papel na patogênese da doença (Cai et al, 2008).

Existem três possibilidades que buscam explicar os processos moleculares que levam à perda sináptica na DA: (1) a perda sináptica é uma consequência não específica de alterações neurodegenerativas globais que inclui perda neuronal, (2) é causada pela toxicidade da proteína β A e (3) é causada por alterações no citoesqueleto pela hiperfosforilação e agregação da proteína tau (Mukaetova-Ladinska et al, 2000).

A análise e caracterização de genes diferencialmente expressos entre as diferentes estruturas neuronais, assim como aquelas envolvidas no mecanismo da transmissão sináptica, podem permitir a identificação de proteínas que contribuem para a função especializada de subpopulações neuronais, além de fornecer novos marcadores moleculares para a investigação da biologia celular da funcionalidade e diferenciação do SNC (Oyler et al, 1989).

Análises de múltiplas proteínas pré-sinápticas na DA demonstraram níveis reduzidos de SNAP25 em cérebros de pacientes com a doença (Shimohama et al, 1997; Greber et al, 1999). Porém, os dados da literatura são controversos e alguns grupos relataram ausência de alterações nos níveis desta proteína na DA (Ferrer et al, 1998; Sze et al, 2000).

Por outro lado, uma aparente resposta bifásica de proteínas sinápticas foi relatada no córtex de pacientes com DA, com significativo aumento de SNAP25 nos estágios iniciais e diminuição progressiva em relação ao estágio neuropatológico da doença (Mukaetova-Ladinska et al, 2000).

2.2.5.3 Gene *SIRT1* [sirtuin (*silent mating type information regulation 2 homolog*) 1 (*S. cerevisiae*)]

Os mamíferos possuem sete proteínas da família das sirtuínas (SIRT1 a SIRT7) que possuem o mesmo domínio catalítico que Sir2 (*silent information regulator 2*) (Yamamoto et al, 2007). O gene Sir2 é uma desacetilase que necessita de uma Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NAD⁺) como cofator e controla a longevidade em eucariotos simples, como *Saccharomyces. cerevisiae* e *Caenorhabditis elegans* (Kaeberlein et al, 1999; Tissenbaum, Guarente, 2001). Em *S. cerevisiae*, uma cópia extra do gene Sir2 prolongou em 30% a duração da vida replicativa, enquanto que a deleção de Sir2 levou à diminuição de 50% da longevidade (Kaeberlein et al, 1999). Da mesma forma, em *C. elegans* uma duplicação contendo Sir2 aumentou a longevidade em até 50% (Tissenbaum, Guarente, 2001). Como Sir2 é dependente de NAD⁺, sugere-se que o controle da longevidade está intimamente associado ao estado metabólico (Michishita et al, 2005).

Membros dessa família de genes de sirtuínas são altamente conservados desde leveduras até humanos, sugerindo que elas possuam um importante papel fisiológico. Em mamíferos, SIRT1, SIRT6 e SIRT7 estão localizadas no núcleo, SIRT2 no citoplasma, SIRT4 e SIRT5 na mitocôndria e SIRT3 no núcleo e na mitocôndria (Yamamoto et al, 2007).

O gene *SIRT1* humano localiza-se em 10q21.3 e sua região promotora contém CCAAT-*box* e sítios de ligação para fatores de transcrição como NF-κB (*nuclear factor - kappa B*) e GATA, além de uma ilha CpG de 350 pb. Seu RNA mensageiro (RNAm) codifica uma proteína de 747 aminoácidos, com peso molecular de 81,7 kDa, a qual modifica diretamente a cromatina e silencia transcrição, modula ponto de checagem meiótico, aumenta a estabilidade genômica e suprime recombinação de RNA ribossômico (RNAr). SIRT1 é um importante mediador da longevidade por meio de uma série de diferentes mecanismos como indução da parada

do ciclo celular, resistência ao estresse oxidativo e inibição da apoptose (Voelter-Mahlknecht, Mahlknecht, 2006).

SIRT1 participa de vários processos biológicos, incluindo diferenciação celular, apoptose, autofagia, desenvolvimento, câncer, metabolismo e ritmo circadiano (Michan et al, 2010). Além disso, outros estudos demonstraram que SIRT1 parece estar envolvida na homeostase de glicose, metabolismo lipídico, reprodução, cardio e neuroproteção (Anastasiou, Krek, 2006). SIRT1 modula essas funções por meio da desacetilação de uma grande variedade de substratos, incluindo histonas, enzimas, fatores de transcrição e componentes da cascata de transdução de sinal (Michan et al, 2010). Entre os substratos de SIRT1 estão a proteína supressora tumoral p53, o fator de transcrição NF- κ B e a família FOXO (*forkhead transcription factor*), de fatores de transcrição (Tang, Chua, 2008).

SIRT1 possui também importante papel em doenças neurodegenerativas como a DA. Julien e colaboradores (2009) observaram uma forte relação entre a diminuição de SIRT1, a duração dos sintomas da DA e acúmulo da proteína tau, indicando que a perda de SIRT1 acompanha a neurodegeneração que ocorre na doença. Porém, não se sabe se essa perda tem papel causal ou é consequência de outros eventos neuropatológicos (Julien et al, 2009).

No mesmo sentido, a superexpressão de *SIRT1* parece ter um efeito neuroprotetor, uma vez que reduziu a sinalização via NF κ B na microglia, que está envolvida na morte neuronal estimulada pelos peptídeos β A. Essas formas oligoméricas solúveis tanto intra como extracelular de β A podem levar ao prejuízo na transmissão sináptica e aos sintomas observados na DA (Tang, Chua, 2008).

A ligação de SIRT1 com a DA e a longevidade pode também estar associada a uma condição de RC. A RC parece aumentar os níveis de SIRT1 em diversos tecidos metabólicos como fígado, músculo e cérebro e é responsável por prolongar a longevidade (Westphal et al, 2007; Tang, Chua, 2008). Na DA, a RC proporcionou benefícios em potencial aos sintomas e à progressão da doença através da atenuação da produção das placas β A, porém, ainda não é claro se isso ocorre via ativação de SIRT1 (Tang, Chua, 2008).

Foi observado que RNAm e níveis protéicos de SIRT1 estavam diminuídos no cérebro de pacientes com DA quando comparados a indivíduos com déficit cognitivo leve e controles (Julien et al, 2009).

Uma vez que as proteínas FOXOs podem estar envolvidas diretamente ou em cooperação com p53 contribuindo para a morte neuronal, foram descritos dois papéis relacionados para SIRT1 nos núcleos dos neurônios afetados pela DA. SIRT1 parece estar envolvido na desacetilação e repressão da atividade de p53, prevenindo a morte dos neurônios por apoptose. A proteína SIRT1 pode também desacetilar e suprimir as atividades apoptóticas de proteínas FOXO e promover a sobrevivência neuronal (Anekonda, Reddy, 2006).

Uma vez que o papel neuroprotetor do gene *SIRT1* ainda não é muito bem compreendido, é necessária melhor investigação do efeito que a sua atividade pode causar aos neurônios, ao envelhecimento e à progressão da DA.

MÉTODOS

3 MÉTODOS

3.1 Casuística

3.1.1 Leucócitos de Sangue Periférico

O presente estudo avaliou amostras de leucócitos de sangue periférico de 25 jovens, 20 idosos saudáveis e 35 pacientes com DA, de ambos os sexos. A Tabela 1 apresenta as médias de idade \pm desvio padrão (DP) e a porcentagem de indivíduos do sexo feminino e masculino para cada grupo. Os grupos de idosos saudáveis e pacientes com DA apresentaram idades semelhantes ($p>0,05$) e os jovens sadios foram recrutados com idades variando entre 18 e 28 anos. Os gêneros não diferiram entre os grupos analisados ($p>0,05$).

Os idosos saudáveis obedeceram aos critérios de exclusão de sequela de acidente vascular encefálico, depressão profunda, demência vascular, baixos níveis cognitivos e alcoolismo. A escala padronizada para avaliação cognitiva foi a do Mini-Exame do Estado Mental (MEEM) (Bertolucci et al, 2001), que avalia as funções corticais de forma simplificada e objetiva, mas com sensibilidade alta para captar alterações. A funcionalidade foi avaliada utilizando a escala de Katz (Katz et al, 1963), que avalia o grau de dependência e divide os pacientes em independentes, parcialmente dependentes e dependentes.

O presente estudo incluiu somente pacientes com a forma esporádica da DA, com idade acima de 65 anos e que apresentaram um mínimo de três anos de evolução da DA. Foi realizada anamnese e exame neurológico detalhado por neurologistas. Os critérios diagnósticos do *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke* e da *Alzheimer's Disease and Related Disorders Association* (NINCDS-ADRDA) foram utilizados para a caracterização da DA (McKhann et al, 1984). Esses critérios foram estabelecidos com base no *IV Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (DSM-IV) com adaptações para o diagnóstico provável de DA, que consistem em perda da memória associada a outro domínio cognitivo, como linguagem, funções executivas, habilidades visuoespaciais e praxias associadas à perda da funcionalidade. Também foram avaliados os coeficientes de demência (CDRs) (Morris et al, 1993), o MEEM e a escala de Katz. Todos os pacientes

com DA foram recrutados no Ambulatório de Neurologia do Comportamento da UNIFESP/EPM, sob supervisão do Prof. Dr. Paulo Henrique Ferreira Bertolucci.

Todos os participantes receberam informações quanto aos objetivos e ao protocolo da pesquisa e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1).

3.1.2 Tecido Cerebral

Foram analisadas de 8 a 10 amostras de tecido cerebral *post mortem* de idosos saudáveis e de 9 a 10 amostras de pacientes com DA, os quais morreram de nenhum outro distúrbio neurológico. As amostras de tecido cerebral foram oriundas de três diferentes regiões cerebrais: córtices entorrinal e auditivo e hipocampo, obtidas por autópsia e congeladas a -80°C até o uso. As regiões cerebrais do córtex entorrinal e hipocampo foram selecionadas por serem áreas primariamente afetadas pela doença e o córtex auditivo por ser uma região afetada posteriormente. As amostras foram disponibilizadas pelo *The Brain Bank – Douglas Hospital Research Centre* (Montreal, Canadá) em colaboração com o Dr. Gustavo Turecki, do Departamento de Genética Psiquiátrica da Universidade McGill. Todas as amostras (com e sem DA) foram processadas da mesma maneira, utilizando os mesmos protocolos. Os pacientes com DA apresentaram uma triagem clínica rigorosa que garante o diagnóstico da DA, tanto pelo acompanhamento do paciente em vida, como por análise do cérebro *post mortem* e apresentaram um mínimo de três anos de evolução da doença.

O grupo de idosos saudáveis não apresentava história de doença neurológica ou psiquiátrica. A Tabela 1 apresenta as médias de idades \pm DP e a porcentagem de indivíduos do sexo feminino e masculino para cada grupo. Idade e gênero não variaram entre os dois grupos ($p>0.05$).

Tabela 1: Caracterização das amostras de leucócitos de sangue periférico de jovens, idosos saudáveis e pacientes com Doença de Alzheimer e de tecido cerebral *post mortem* de idosos saudáveis e pacientes com Doença de Alzheimer.

Tecido	Grupo	N	Média Idade ± DP (anos)	Sexo (%) ♀/♂
	Jovens	25	21,68±1,57	76,0/24,0
Sangue	Idosos Saudáveis	20	74,20±9,11	70,0/30,0
	Pacientes com DA	35	76,03±8,26	68,6/31,4
Cérebro	Idosos Saudáveis	10	78,5±9,2	60,0/40,0
	Pacientes com DA	10	80,1±7,0	50,0/50,0

DA: Doença de Alzheimer; N: Número de indivíduos; DP: Desvio Padrão; %: porcentagem; ♀: sexo feminino; ♂: sexo masculino.

3.1.3 Comitê de Ética

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UNIFESP sob o nome “Análise quantitativa da metilação do DNA e expressão de genes relevantes à Doença de Alzheimer”, com número de registro 1944/08 (Anexo 2).

3.2 Metodologia

3.2.1 Extração de RNA e síntese de cDNA

Foram coletados 5 mL de sangue periférico de cada indivíduo e foi utilizado *RiboPure™-Blood Kit* (Ambion, EUA) para a extração de RNA, segundo instruções do fornecedor.

Resumidamente, após a coleta de sangue, foi adicionada solução de lise e de acetato de sódio e, logo após, solução de fenol-ácido/clorofórmio. Após 5 min à temperatura ambiente e breve centrifugação, a fase aquosa superior foi transferida para outro tubo ao qual foi adicionado etanol 100%. Alíquotas dessa mistura foram então transferidas a um filtro juntamente com tampão de lavagem e foram submetidas a sucessivas centrifugações. Em seguida, tampão de eluição (pré-aquecido a 75°C) foi adicionado ao filtro e a mistura passou por mais uma centrifugação. O RNA eluído foi então armazenado para utilização nas etapas posteriores.

Em relação às amostras de cérebro, o tecido foi tratado com *RNAlater® Tissue Collection: RNA Stabilization Solution* (Ambion, EUA) e estocado a -20°C. Antes

da extração o tecido foi retirado do freezer e descongelado completamente, foi cortado um pedaço suficiente para a extração (no máximo 100 mg) com bisturi e retirado o excesso da solução de *RNA later* com uma gaze estéril. Em seguida o pedaço de tecido foi pesado e pulverizado em cadinho/pistilo com nitrogênio líquido. Após este procedimento foi seguido o protocolo de extração de RNA por meio de *RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit* (QIAGEN, Alemanha), segundo instruções do fabricante.

Resumidamente, o tecido foi homogeneizado e colocado à temperatura ambiente por 5 min. Em seguida foi adicionado clorofórmio e a mistura foi mantida a temperatura ambiente por mais 3 min e submetida à centrifugação a 12000g/15min/4°C. A fase aquosa do centrifugado foi então transferida para outro tubo ao qual foi adicionado etanol 70%. A mistura foi transferida para um tubo contendo uma coluna e centrifugada a 8000g/15s à temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado tampão de lavagem à coluna e a amostra foi submetida novamente à mesma centrifugação. Um novo tampão de lavagem foi adicionado e a mistura foi centrifugada inicialmente a 8000g/15s e posteriormente a 8000g/2min para secar a membrana da coluna. Por fim, para eluição do RNA, adicionou-se água *RNAse-free* na coluna e esta foi centrifugada a 8000g/1min.

As amostras de RNA foram estocadas a -80°C até serem utilizadas. A concentração de RNA e as razões de absorbância 230/260 e 260/280 foram medidas pelo aparelho NanoDrop (Spectrophotometer ND - 1000 - NANODROP, EUA) e somente amostras com valores de razões entre 1,9 e 2,1 foram selecionadas.

A síntese do DNA complementar (cDNA) a partir do RNA (Figura 6) utilizou *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* (Applied Biosystems™, EUA), onde 1 µL de RNA total foi adicionado a um *Master Mix* contendo 2 µL de 10X *Reverse Transcription Buffer*, 0,8 µL de *dNPT Mix*, 2 µL de 10X *Reverse Transcription Random Primers*, 1 µL de *Reverse Transcriptase*, 1 µL de inibidor de RNase e 11,2 µL de H₂O *Nuclease-free*, totalizando um volume final de 20 µL. A mistura foi, submetida às seguintes etapas: 25°C/10min, 37°C/120min, 85°C/5min e, então, armazenada a 4°C.

As amostras de cDNA foram quantificadas e as razões de absorbância novamente avaliadas. As amostras foram utilizadas em uma concentração final de 100 ng/µL. Além disso, foram construídos três agrupamentos de amostras (*pools*) de cDNA,

um *pool* para cada grupo de amostras de indivíduos jovens, idosos saudáveis e pacientes com DA de leucócitos de sangue periférico, para a quantificação da expressão do gene *SNAP25*.

3.2.2 qRT-PCR (*quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*)

A análise da expressão dos genes alvos *LR11*, *SNAP25* e *SIRT1* em leucócitos de sangue periférico e em tecido cerebral foi realizada por meio da técnica de qRT-PCR, onde foram utilizados *primers* e sondas MGB *TaqMan*[®] (marcados com fluoróforo FAM[™]) dos Ensaio de Expressão Gênica *TaqMan*[®] Hs00268342-m1, Hs00938957-m1 e Hs01009006-m1, respectivamente, comercializados pela Applied Biosystem (Applied Biosystems[™], EUA). O gene β actina (*ACTB*) foi escolhido como controle endógeno para a reação e sua corrida foi realizada paralelamente a reação dos genes alvos estudados e seu ensaio, Hs03023943-g1, também foi adquirido comercialmente (Applied Biosystems[™], EUA). Os Ensaio de Expressão Gênica *TaqMan*[®] inventoriados apresentam eficiências de amplificação de 100%, sendo que uma reação 100% eficiente produz um aumento de 10 vezes no *amplicon* da PCR a cada 3,32 ciclos durante a fase exponencial de amplificação. A fim de confirmar essas eficiências, foram construídas curvas padrões para todos os genes estudados (alvos e endógeno), de modo que todas se apresentaram em torno de 100%.

Uma alíquota de cDNA foi utilizada para a qRT-PCR utilizando o ensaio *TaqMan*, com princípio na ação exonuclease da *Taq DNA polimerase*, com uma sonda repórter fluorescente 5' e um *quencher* (silenciador) 3'. Após a desnaturação, os *primers* e a sonda se anelam aos seus alvos. Durante o passo de polimerização, a *Taq DNA polimerase* cliva e separa fisicamente a sonda repórter do *quencher*, resultando na liberação do sinal fluorescente (Figura 7) (Bustin, Mueller, 2005), que é detectado pelo aparelho *7500 Fast Real-Time PCR* (Applied Biosystems[™], EUA). O aumento do sinal é diretamente proporcional ao número de moléculas amplificadas durante cada ciclo. É necessário amplificar pelo menos 3 réplicas de cada amostra, tanto para o gene alvo quanto para o endógeno, para garantir a precisão dos resultados. Somente uma pequena variação da triplicata é tolerada, sendo que réplicas com DP de C_T (*cycle threshold*) $>0,3$ foram repetidas ou excluídas da análise.

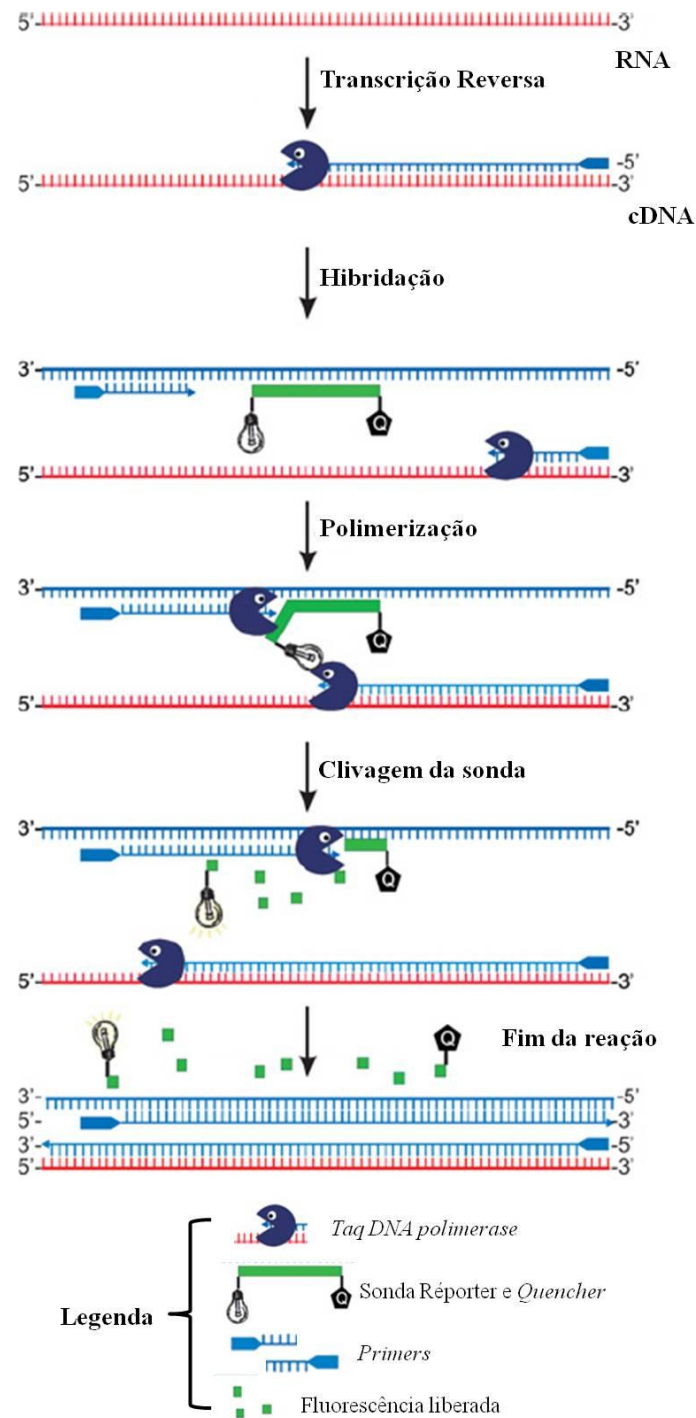


Figura 7: Síntese de cDNA a partir de RNA total, seguido de amplificação por qRT-PCR, por meio do princípio do ensaio *TaqMan*. Resumidamente, após a desnaturação, os *primers* e a sonda se anelam aos seus alvos. Durante o passo de polimerização, a *Taq DNA polimerase* cliva e separa fisicamente a sonda repórter do *quencher*, resultando na liberação do sinal fluorescente, que é captado pelo aparelho. Modificado de Bustin, Mueller, 2005.

As condições da PCR padronizadas para todos os Ensaios de Expressão Gênica *TaqMan*[®] foram: 1 µL de cDNA de cada amostra (100 ng/µL), 0,6 µL do Ensaio de Expressão Gênica *TaqMan*[®] 20X e 6 µL de *QuantiTect Probe PCR Master Mix 2X* (QIAGEN, Alemanha), completados com água para volume final de 12 µL. A mistura passa por uma desnaturação inicial de 10 min a 94°C, seguido de 45 ciclos de desnaturação a 95°C por 15s, anelamento e extensão a 60°C por 60s. A confiabilidade das amostras de RNA foi assegurada pela escolha de sondas MGB *Taqman*[®] que se estendem sobre junções éxon-éxon, onde o DNA genômico foi excluído como *template* na PCR em Tempo Real.

O *baseline* foi calculado automaticamente pelo aparelho e o *threshold* foi ajustado manualmente para cada gene estudado. O método escolhido para quantificação da expressão gênica foi o método C_T comparativo (Método $\Delta\Delta C_T$), que se baseia nos valores dos C_T dos genes alvos e do gene endógeno. O C_T é o número do ciclo no qual a fluorescência gerada dentro de uma reação cruza a linha *threshold*, que é fixado na fase exponencial da curva de amplificação. Isso indica que amostras com C_T menor possuem amplificação mais precoce, ou seja, possuem mais cópias de cDNA do gene estudado do que amostras que possuem um C_T mais tardio. É obtida uma média de C_T para cada replicata técnica e é calculado o valor de ΔC_T ($C_{T \text{ gene alvo}} - C_{T \text{ gene endógeno}}$) a fim de normalizar a quantidade de um alvo em relação à referência endógena escolhida. Os valores de $2^{-\Delta C_T}$ foram os valores utilizados para os cálculos estatísticos necessários. Por fim, foi calculada a Quantificação Relativa (QR) ou *fold change* com o uso da fórmula aritmética $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ($2^{-\Delta C_T \text{ grupo de interesse}} / 2^{-\Delta C_T \text{ grupo referência}}$) que significa o quanto um gene foi expresso no grupo de interesse em relação ao grupo referência. Para o cálculo da QR, o grupo referência foi escolhido aleatoriamente. Os valores de C_T e ΔC_T foram calculados por meio do *7500 software 2.0* e esses dados foram, então, exportados para o Microsoft[®] Excel para o cálculo do $2^{-\Delta C_T}$ e da QR.

3.2.3 Análise Estatística

Inicialmente foram realizados testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e de homogeneidade (Levene) para a variável dependente ($2^{-\Delta C_T}$), além de observar o tamanho amostral para cada análise, a fim de definir o teste como paramétrico ou não-paramétrico. Nas distribuições que não obedeceram à normalidade e homogeneidade

e/ou não apresentaram número amostral maior que 20 foram utilizados testes não-paramétricos. Nas comparações dois a dois foi utilizada a correção de Bonferroni, na qual o índice de significância ($p=0,05$) é dividido pelo número de testes independentes realizados, com a finalidade de diminuir a quantidade de resultados falsos positivos.

Para a análise da expressão em leucócitos de sangue periférico, foi utilizado o teste ANOVA de uma via, com *post-hoc* de Bonferroni ou teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Mann-Whitney com correção de Bonferroni ($p<0,017$) a fim de verificar se há diferença de expressão dos genes entre os grupos de jovens, idosos saudáveis e pacientes com DA.

Em relação à análise de expressão em tecido cerebral, a comparação entre as três regiões cerebrais (córtices entorrinal e auditivo e hipocampo) tanto dentro do grupo de idosos saudáveis quanto do grupo de pacientes com DA foi realizada por uma análise pareada uma vez que cada um dos indivíduos analisados possuía dados para as três regiões cerebrais. Desta forma, foi realizado teste de Friedman, seguido de Wilcoxon com correção de Bonferroni ($p<0,017$) uma vez que o número amostral ($n=10$) permitiu somente uma análise não paramétrica.

Para verificar se a expressão gênica de cada uma das diferentes regiões cerebrais diferiu entre idosos saudáveis e pacientes com DA, foi utilizado teste t de *Student* ou Mann-Whitney. Nesta análise, um Modelo Linear Geral (GLM) foi utilizado para calcular o tamanho do efeito e o poder observado, que avaliam erro tipo I e II, respectivamente, além de realizar eventuais ajustes para a covariante idade. São considerados satisfatórios valores de tamanho de efeito e poder observado, maiores que 15% e 80%, respectivamente.

Para verificar se houve diferença de expressão entre leucócitos de sangue periférico de idosos saudáveis e de pacientes com DA e as três regiões cerebrais, os dados dos leucócitos de sangue periférico foram incluídos como um quarto grupo nesta análise e foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Mann-Whitney com correção de Bonferroni ($p<0,017$).

Os resultados são apresentados como média de $2^{-\Delta CT} \pm DP$ (teste paramétricos) ou mediana de $2^{-\Delta CT}$ e seus respectivos valores de desvio interquartilício (DIQ) (testes não-paramétricos).

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o pacote estatístico SPSS® 18.0 e a hipótese nula foi rejeitada com valores de $p < 0,05$. Para as análises em que se aplicou a correção de Bonferroni, p foi considerado significativo com valores menores que 0,017.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

Os anexos 3 e 4 apresentam os valores de ΔC_T e de $2^{-\Delta C_T}$ obtidos para cada amostra para cada um dos três genes estudados, além de sexo, idade e grupo.

Uma vez que cada amostra possui valores únicos de $2^{-\Delta C_T}$, essa variável foi utilizada para realizar as comparações estatísticas entre os grupos. No entanto, para que seja possível identificar quanto um gene é mais expresso no grupo de interesse em relação ao grupo referência, é necessário o cálculo da QR. Desta forma, as Figuras 8 a 15 foram apresentadas da seguinte forma: **A)** comparação estatística entre os valores de $2^{-\Delta C_T}$ de cada grupo e **B)** valor da QR ou *fold change* do grupo de interesse em relação ao grupo referência (QR=1).

4.1 Gene *LR11*

4.1.1 Expressão em leucócitos de sangue periférico

Foram amplificadas todas as amostras de leucócitos de sangue periférico dos grupos de jovens, idosos saudáveis e pacientes com DA para o gene *LR11*.

O teste de Shapiro-Wilk mostrou que a variável dependente ($2^{-\Delta C_T}$) não obedeceu à distribuição normal e o teste de Kruskal-Wallis encontrou diferença de expressão entre os três grupos analisados ($\chi^2=12,53$; $p=0,002$). Por sua vez, o teste de Mann-Whitney com correção de Bonferroni, considerando significativo um p menor que 0,017, não detectou diferença entre os grupos de pacientes com DA e idosos saudáveis ($p=0,986$), mas mostrou diferença de expressão entre o grupo de jovens e idosos saudáveis ($p=0,003$) e entre o grupo de jovens e pacientes com DA ($p=0,001$) (Tabela 2; Figura 8A).

Para o cálculo da QR foi utilizado o grupo de jovens como referência. O grupo de idosos saudáveis apresentou uma QR de 3,58 e o grupo de pacientes com DA uma QR de 3,44 em relação grupo de jovens (QR=1) (Tabela 2; Figura 8B). Ambos os grupos apresentaram uma maior expressão do gene *LR11* em relação ao grupo de jovens.

Tabela 2: Resultado do teste Kruskal-Wallis comparando os valores de $2^{-\Delta CT}$ entre os grupos de jovens, idosos saudáveis e pacientes com DA em leucócitos de sangue periférico para o gene *LR11*.

	Sangue	N	$2^{-\Delta CT}$ Mediana	DIQ	p*	QR [#]
	Jovens	25	0,221	0,73		1,00
Grupo	Idosos Saudáveis	20	0,790	0,90	0,002	3,58
	Pacientes com DA	35	0,758	0,43		3,44

N: Número de indivíduos; DIQ: Desvio Interquartilico; p*: teste de Kruskal-Wallis; QR[#]: Quantificação Relativa em relação ao grupo de jovens; DA: Doença de Alzheimer; Teste de Mann-Whitney: Jovem X Idoso: U=122,0; p=0,003; Jovem X DA: U=224,5; p=0,001 e Idoso X DA: U=349,0; p=0,986.

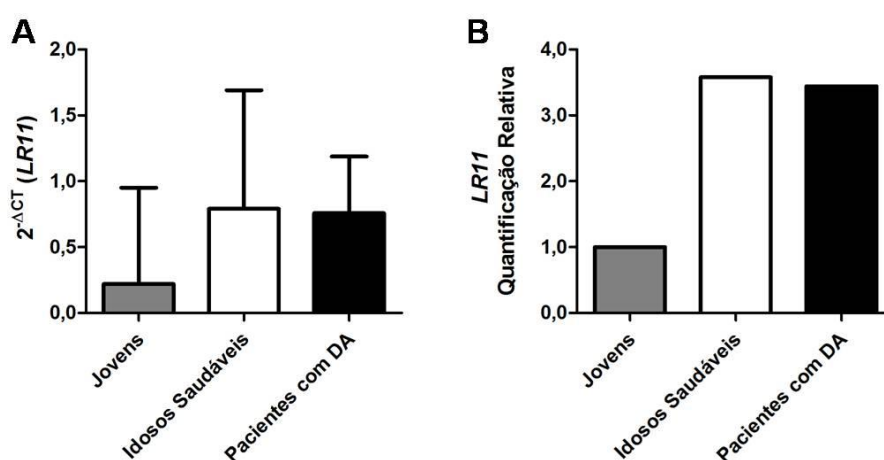


Figura 8: **A)** Comparação dos valores de $2^{-\Delta CT}$ do gene *LR11* entre os grupos de jovens, idosos saudáveis e pacientes com Doença de Alzheimer em leucócitos de sangue periférico. **B)** Quantificação Relativa (QR) do gene *LR11* em leucócitos de sangue periférico do grupo de idosos saudáveis e pacientes com Doença de Alzheimer, utilizando grupo de jovens como referência (QR=1). DA: Doença de Alzheimer.

4.1.2 Expressão em tecido cerebral

Foram amplificadas 10 amostras de tecido cerebral do grupo de idosos saudáveis e 9 amostras do grupo de pacientes com DA, de cada uma das três regiões estudadas: córtices entorrinal e auditivo e hipocampo.

Em relação ao grupo de idosos saudáveis, utilizamos o teste de Friedman e foi detectado que o gene *LR11* encontrou-se diferencialmente expresso entre as três regiões cerebrais analisadas ($\chi^2=7,40$; p=0,025). O teste de Wilcoxon com correção de Bonferroni não encontrou significância, levando em consideração um p significativo

menor que 0,017, embora tenha mantido uma tendência à diferença entre o córtex entorrinal e o córtex auditivo ($p=0,028$) e entre o hipocampo e o córtex auditivo ($p=0,028$).

No grupo de pacientes com DA não houve diferença de expressão entre as três regiões cerebrais analisadas ($\chi^2=1,56$; $p=0,459$).

Não foi detectada diferença significativa quando a expressão desse gene para cada uma das três regiões cerebrais foi comparada entre o grupo de idosos saudáveis e pacientes com DA ($p>0,05$).

4.1.3 Comparação da expressão entre leucócitos de sangue periférico e tecido cerebral

O teste de Shapiro-Wilk mostrou que a variável dependente ($2^{-\Delta CT}$) não obedeceu à distribuição normal. O teste de Kruskal-Wallis detectou diferença significativa entre a expressão do gene *LR11* em leucócitos de sangue periférico e as três regiões do tecido cerebral tanto para o grupo de idosos saudáveis ($\chi^2=31,95$; $p<0,001$), quanto para o grupo de pacientes com DA ($\chi^2=40,54$; $p<0,001$). Para detectar quais regiões cerebrais diferiram dos leucócitos de sangue periférico, o teste de Mann-Whitney com correção de Bonferroni, considerando significativo p menor que 0,017, detectou diferença de expressão entre os leucócitos de sangue periférico e o córtex entorrinal ($p<0,001$), córtex auditivo ($p<0,001$) e hipocampo ($p<0,001$) para ambos os grupos (Tabela 3; Figuras 9A e 10A).

Para o cálculo da QR foram utilizados os leucócitos de sangue periférico como referência (QR=1) para o grupo de idosos saudáveis e de pacientes com DA. Para o grupo de idosos saudáveis, os valores de QR foram de 0,12, 0,24 e 0,15 para o córtex entorrinal, córtex auditivo e hipocampo, respectivamente (Tabela 3; Figura 9B). Para o grupo de pacientes com DA, os valores de QR foram de 0,19, 0,22 e 0,15 para o córtex entorrinal, córtex auditivo e hipocampo, respectivamente (Tabela 3; Figura 10B). Todas as regiões cerebrais apresentaram uma menor expressão do gene *LR11* em relação aos leucócitos de sangue periférico para ambos os grupos estudados.

Tabela 3: Resultado do teste Mann-Whitney comparando os valores de $2^{-\Delta CT}$ entre leucócitos de sangue periférico e as três regiões cerebrais no grupo de idosos saudáveis e no grupo de pacientes com Doença de Alzheimer para o gene *LR11*.

Tecido	Grupo Idosos Saudáveis					Grupo Pacientes com DA						
	N	$2^{-\Delta CT}$ Mediana	DIQ	U	p [#]	QR	N	$2^{-\Delta CT}$ Mediana	DIQ	U	p [#]	QR
Sangue	20	0,790	0,90	-	-	1,00	35	0,758	0,43	-	-	1,00
Córtex Entorrinal	10	0,093	0,08	7	<0,001*	0,12	9	0,146	0,06	9	<0,001*	0,19
Córtex Auditivo	10	0,186	0,09	10	<0,001*	0,24	9	0,164	0,04	9	<0,001*	0,22
Hipocampo	10	0,118	0,08	6	<0,001*	0,15	9	0,1123	0,08	9	<0,001*	0,15

N: Número de indivíduos; DIQ: Desvio Interquartil; p[#]: valor de p em relação ao sangue; *p<0,05; QR: Quantificação Relativa em relação ao sangue; DA: Doença de Alzheimer.

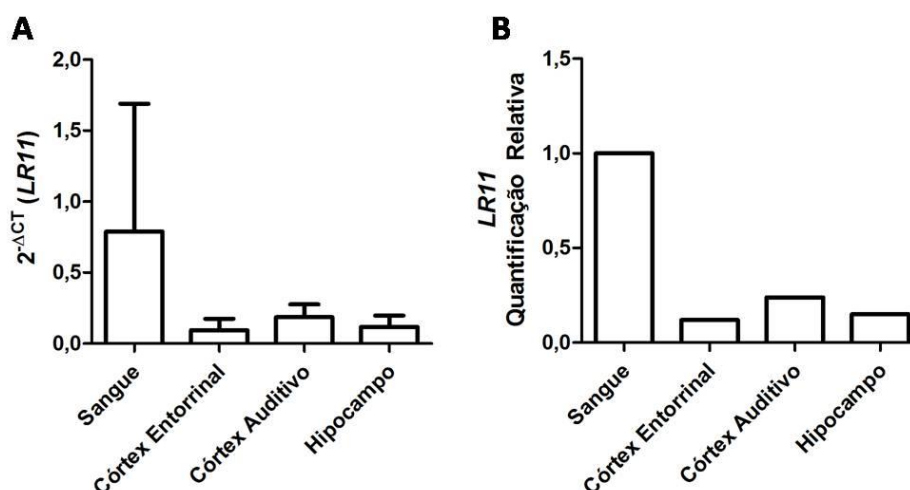


Figura 9: **A)** Comparação dos valores de $2^{-\Delta CT}$ do gene *LR11* entre os tecidos sangue, córtex entorrinal, córtex auditivo e hipocampo no grupo de idosos saudáveis. **B)** Quantificação Relativa (QR) do gene *LR11* nas três regiões cerebrais, utilizando os leucócitos de sangue periférico como referência (QR=1) no grupo de idosos saudáveis.

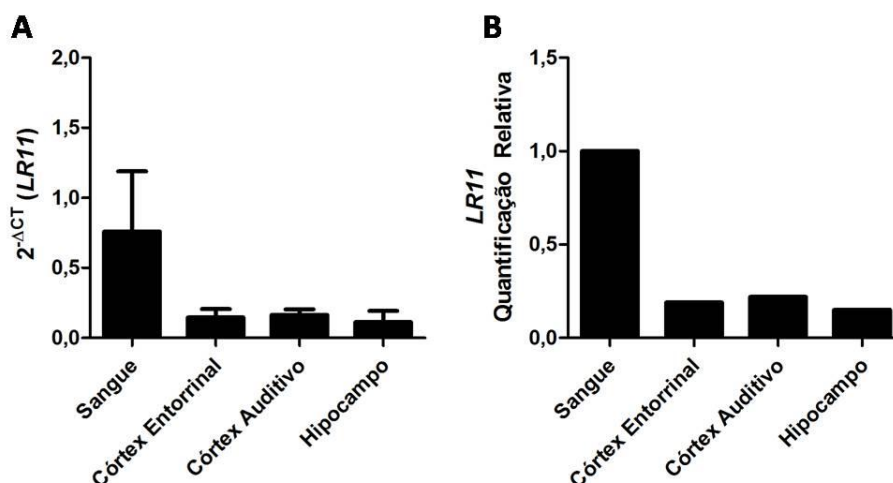


Figura 10: A) Comparação dos valores de $2^{-\Delta CT}$ do gene *LR11* entre os tecidos sangue, córtex entorrinal, córtex auditivo e hipocampo no grupo de pacientes com Doença de Alzheimer. **B)** Quantificação Relativa (QR) do gene *LR11* nas três regiões cerebrais, utilizando os leucócitos de sangue periférico como referência (QR=1) no grupo de pacientes com Doença de Alzheimer.

4.2 Gene *SNAP25*

4.2.1 Expressão em leucócitos de sangue periférico

Nas padronizações iniciais da amplificação do gene *SNAP25* para análise de sua expressão, foi observado que este gene não apresentava amplificação em leucócitos de sangue periférico. A fim de confirmar esses resultados, foi realizada a técnica de qRT-PCR utilizando três *pools* de cDNA, um *pool* para cada grupo de amostras de indivíduos de jovens, idosos saudáveis e pacientes com DA.

O gene *SNAP25* não apresentou expressão neste tecido, uma vez que nenhum dos *pools* analisados obteve amplificação pelo método de qRT-PCR.

4.2.2 Expressão em tecido cerebral

Para o gene *SNAP25* foram amplificadas 10 amostras de tecido cerebral do grupo de idosos saudáveis e 10 amostras do grupo de pacientes com DA, de cada uma das três regiões estudadas: córtices entorrinal e auditivo e hipocampo.

Em relação ao grupo de idosos saudáveis, utilizamos o teste de Friedman e foi detectado que o gene *SNAP25* encontrou-se diferencialmente expresso entre as

três regiões cerebrais analisadas ($\chi^2=13,28$; $p=0,001$). O teste de Wilcoxon com correção de Bonferroni, considerando um p significativo menor que 0,017, mostrou diferença de expressão entre os córtices entorrinal e auditivo ($p=0,005$) e entre o hipocampo e o córtex auditivo ($p=0,007$), porém não detectou diferença entre o córtex entorrinal e o hipocampo ($p=0,314$) (Tabela 4; Figura 11A). O córtex auditivo foi escolhido como referência para o cálculo da QR. O córtex entorrinal apresentou uma QR de 0,41 e o hipocampo uma QR de 0,49 em relação ao córtex auditivo (QR=1) (Figura 11B).

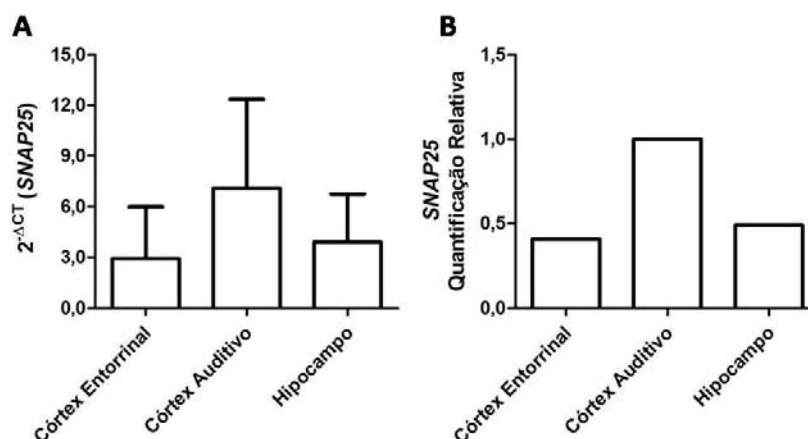


Figura 11: **A)** Comparação dos valores de $2^{-\Delta CT}$ do gene *SNAP25* entre o córtex entorrinal, córtex auditivo e hipocampo no grupo de idosos saudáveis. **B)** Quantificação Relativa (QR) do gene *SNAP25* em tecido cerebral de idosos saudáveis, utilizando o córtex auditivo como referência (QR=1).

No grupo de pacientes com DA não houve diferença de expressão entre as três regiões cerebrais analisadas ($\chi^2=5,60$; $p=0,061$).

A fim de detectar se cada uma das regiões cerebrais diferiu entre o grupo de idosos saudáveis e de pacientes com DA foi realizado um teste t de *Student*, uma vez que variável dependente ($2^{-\Delta CT}$) obedeceu à distribuição normal e este teste mostrou diferença significativa entre todas as regiões cerebrais estudadas: córtex entorrinal ($p=0,008$), córtex auditivo ($p=0,018$) e hipocampo ($p=0,002$) (Tabela 4; Figura 12A). As estimativas de tamanho de efeito e poder observado estão representados na Tabela 4. Foi utilizado o grupo de idosos saudáveis como referência para o cálculo da QR. Os valores de QR foram 0,37, 0,39 e 0,34 para o córtex entorrinal, o córtex auditivo e o hipocampo, respectivamente, para o grupo de pacientes com DA em

relação ao grupo de idosos saudáveis (QR=1) (Tabela 4; Figura 12B). Todas as regiões cerebrais apresentaram níveis de expressão diminuídos no grupo de pacientes com DA em relação ao grupo de idosos saudáveis.

Tabela 4: Resultado do teste t de *Student* comparando os valores de $2^{-\Delta CT}$ entre as três regiões cerebrais do grupo de pacientes com Doença de Alzheimer em relação ao grupo de idosos saudáveis para o gene *SNAP25*.

Região Cerebral	Grupo Idosos Saudáveis		Grupo Pacientes com DA		t	gl	p	QR	Tamanho do efeito	Poder observado
	N	$2^{-\Delta CT}$ Média \pm DP	N	$2^{-\Delta CT}$ Média \pm DP						
Córtex Entorrinal	10	3,18 \pm 1,80	10	1,19 \pm 0,88	3,130	18	0,008*	0,37	35,2%	84,1%
Córtex Auditivo	10	7,83 \pm 5,16 [#]	10	3,02 \pm 2,69	2,614	18	0,018*	0,39	27,5%	69,6%
Hipocampo	10	3,85 \pm 1,77	10	1,30 \pm 1,27	3,698	18	0,002*	0,34	43,2%	93,8%

N: Número de indivíduos; DP: Desvio Padrão; DA: Doença de Alzheimer; gl: grau de liberdade; QR: Quantificação Relativa; * $p < 0,05$; [#]Teste de Wilcoxon: $p = 0,005$ em relação ao córtex entorrinal e $p = 0,013$ em relação ao hipocampo.

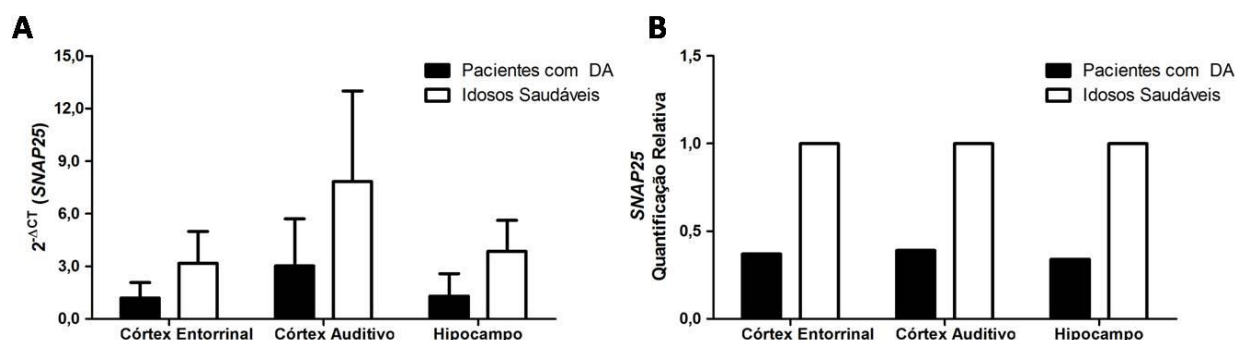


Figura 12: **A)** Comparação dos valores de $2^{-\Delta CT}$ do gene *SNAP25* entre o córtex entorrinal, córtex auditivo e hipocampo do grupo de pacientes com Doença de Alzheimer e de idosos saudáveis. **B)** Quantificação Relativa (QR) do gene *SNAP25* para as três regiões cerebrais no grupo de pacientes com Doença de Alzheimer, utilizando o grupo de idosos saudáveis como referência (QR=1). DA: Doença de Alzheimer.

Esses resultados apresentaram valores de tamanho de efeito e poder observado próximos aos valores satisfatórios, indicando que as diferenças encontradas possuem significância prática confiável.

4.2.3 Comparação da expressão entre leucócitos de sangue periférico e tecido cerebral

Não foi possível comparar a expressão entre os dois tecidos estudados, uma vez que não foi detectada expressão do gene *SNAP25* em leucócitos de sangue periférico.

4.3 Gene *SIRT1*

4.3.1 Expressão em leucócitos de sangue periférico

Foram amplificadas 24, 20 e 35 amostras de leucócitos de sangue periférico dos grupos de jovens, idosos saudáveis e pacientes com DA, respectivamente, para o gene *SIRT1*. Não foi detectada diferença de expressão para este gene entre os grupos ($F=1,156$; $p=0,320$).

4.3.2 Expressão em tecido cerebral

Para o gene *SIRT1* foram amplificadas 8 amostras de tecido cerebral do grupo de idosos saudáveis e 9 amostras do grupo de pacientes com DA, de cada uma das três regiões estudadas: córtices entorrinal e auditivo e hipocampo.

Não houve diferença de expressão entre as três regiões cerebrais analisadas (córtices entorrinal e auditivo e hipocampo) tanto para o grupo de idosos ($\chi^2=3,25$; $p=0,197$) quanto para o grupo de pacientes com DA ($\chi^2=4,67$; $p=0,097$).

A fim de detectar se cada uma das regiões cerebrais diferiu entre o grupo de idosos saudáveis e de pacientes com DA foi realizado teste de Mann-Whitney, uma vez que a variável dependente ($2^{-\Delta CT}$) não obedeceu à distribuição normal, e este teste mostrou diferença significativa entre todas as regiões cerebrais estudadas: córtex entorrinal ($p=0,001$), córtex auditivo ($p=0,019$) e hipocampo ($p=0,040$) (Tabela 5, Figura 13A). Foi utilizado o grupo de idosos como referência para o cálculo da QR. Os valores de QR foram 2,42, 2,17 e 2,04 para o córtex entorrinal, o córtex auditivo e o hipocampo, respectivamente, para o grupo de pacientes com DA em relação ao grupo de idosos saudáveis (QR=1) (Tabela 5; Figura 13B). Todas as regiões cerebrais

apresentaram níveis de expressão aumentados no grupo de pacientes com DA em relação ao grupo de idosos saudáveis.

Tabela 5: Resultado do teste Mann-Whitney comparando os valores de $2^{-\Delta CT}$ entre as três regiões cerebrais do grupo de pacientes com Doença de Alzheimer em relação ao grupo de idosos saudáveis para o gene *SIRT1*.

Região Cerebral	Grupo Idosos Saudáveis			Grupo Pacientes com DA			U	p	QR	Tamanho do efeito	Poder observado
	N	$2^{-\Delta CT}$ Mediana	DIQ	N	$2^{-\Delta CT}$ Mediana	DIQ					
Córtex Entorrinal	10	0,00292	0,0021	9	0,00708	0,0040	7	0,001*	2,42	35,7%	82,5%
Córtex Auditivo	9	0,00370	0,0024	9	0,00803	0,0119	14	0,019*	2,17	35,4%	79,3%
Hipocampo	9	0,00321	0,0010	9	0,006545	0,0051	17	0,040*	2,04	28,0%	65,0%

N: Número de indivíduos; DIQ: Desvio Interquartilico; DA: Doença de Alzheimer; QR: Quantificação Relativa; *p<0,05.

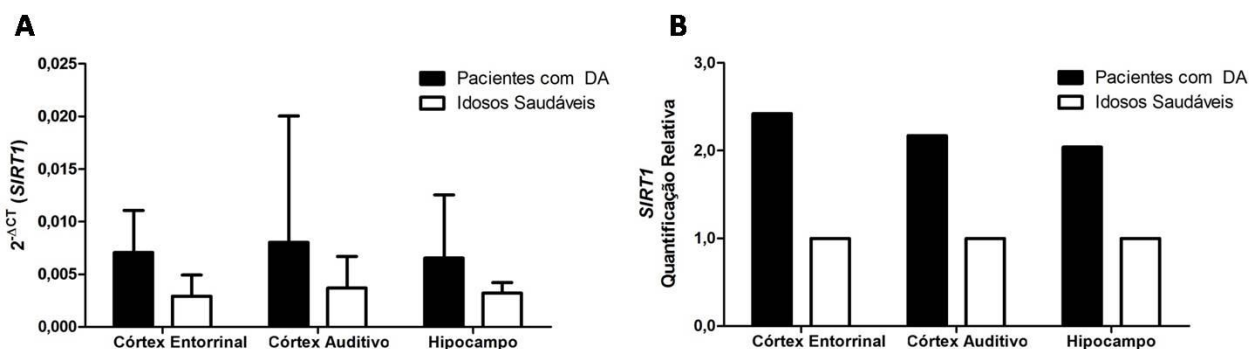


Figura 13: A) Comparação dos valores de $2^{-\Delta CT}$ do gene *SIRT1* entre o córtex entorrinal, córtex auditivo e hipocampo do grupo de pacientes com Doença de Alzheimer e de idosos saudáveis. **B)** Quantificação Relativa (QR) do gene *SIRT1* para as três regiões cerebrais no grupo de pacientes com Doença de Alzheimer, utilizando o grupo de idosos saudáveis como referência (QR=1). DA: Doença de Alzheimer.

Esses resultados apresentaram valores de tamanho de efeito e poder observado próximos aos valores satisfatórios, indicando que as diferenças encontradas possuem significância prática confiável.

4.3.3 Comparação da expressão entre leucócitos de sangue periférico e tecido cerebral

O teste de Shapiro-Wilk mostrou que a variável dependente ($2^{-\Delta CT}$) não obedeceu à distribuição normal. O teste de Kruskal-Wallis detectou diferença significativa na expressão do gene *SIRT1* entre leucócitos de sangue periférico e as três regiões do tecido cerebral, tanto para o grupo de idosos saudáveis ($\chi^2=34,83$; $p<0,001$), quanto para o grupo de pacientes com DA ($\chi^2=30,51$; $p<0,001$). Para detectar quais regiões cerebrais diferiram dos leucócitos de sangue periférico, o teste de Mann-Whitney com correção de Bonferroni, considerando significativo um p menor que 0,017, detectou diferença de expressão entre os leucócitos de sangue periférico e o córtex entorrinal ($p<0,001$), córtex auditivo ($p<0,001$) e hipocampo ($p<0,001$) para ambos os grupos (Tabela 6, Figura 14A e 15A).

Para o cálculo da QR foram utilizados os leucócitos de sangue periférico como referência para o grupo de idosos saudáveis e de pacientes com DA. Para o grupo de idosos saudáveis, os valores de QR foram de 0,14, 0,17 e 0,15 para o córtex entorrinal, córtex auditivo e hipocampo, respectivamente (Tabela 6; Figura 14B). Para o grupo de pacientes com DA, os valores de QR foram de 0,26, 0,30 e 0,24 para o córtex entorrinal, córtex auditivo e hipocampo, respectivamente (Tabela 6; Figura 15B). Todas as regiões cerebrais apresentaram uma menor expressão do gene *SIRT1* em relação aos leucócitos de sangue periférico em ambos os grupos estudados.

Tabela 6: Resultado do teste de Mann-Whitney comparando os valores de $2^{-\Delta CT}$ entre leucócitos de sangue periférico e as três regiões cerebrais no grupo de idosos saudáveis e no grupo de pacientes com Doença de Alzheimer para o gene *SIRT1*.

Tecido	Grupo Idosos Saudáveis						Grupo Pacientes com DA					
	N	$2^{-\Delta CT}$ Mediana	DIQ	U	$p^\#$	QR	N	$2^{-\Delta CT}$ Mediana	DIQ	U	$p^\#$	QR
Sangue	20	0,02131	0,024	-	-	1,00	35	0,02720	0,029	-	-	1,00
Córtex Entorrinal	10	0,00292	0,002	0	<0,001*	0,14	9	0,00708	0,004	28	<0,001*	0,26
Córtex Auditivo	10	0,00370	0,003	0	<0,001*	0,17	9	0,00803	0,012	37	<0,001*	0,30
Hipocampo	10	0,00321	0,001	0	<0,001*	0,15	9	0,00655	0,006	21	<0,001*	0,24

N: Número de indivíduos; DIQ: Desvio Interquartil; QR: Quantificação Relativa em relação ao sangue; DA: Doença de Alzheimer; * $p < 0,05$; $p^\#$: valor de p em relação ao sangue.

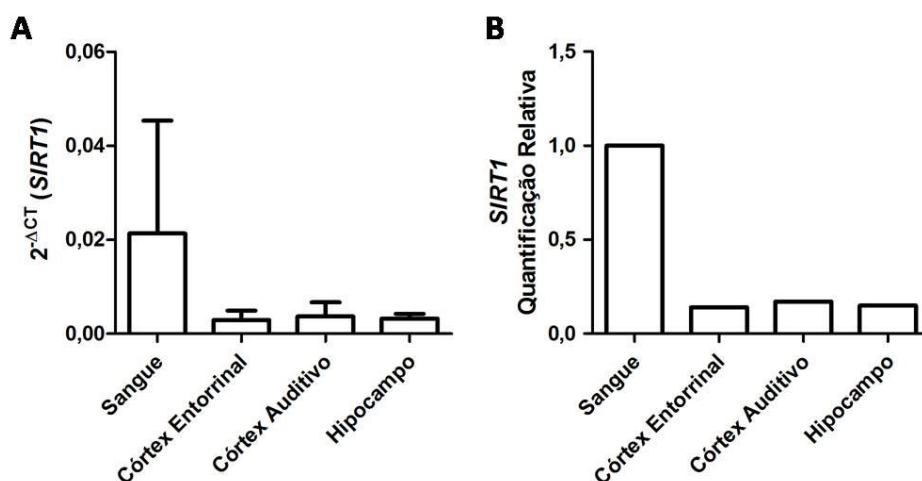


Figura 14: **A)** Comparação dos valores de $2^{-\Delta CT}$ do gene *SIRT1* entre os tecidos sangue, córtex entorrinal, córtex auditivo e hipocampo no grupo de idosos saudáveis. **B)** Quantificação Relativa (QR) do gene *SIRT1* nas três regiões cerebrais, utilizando os leucócitos de sangue periférico como referência (QR=1) no grupo de idosos saudáveis.

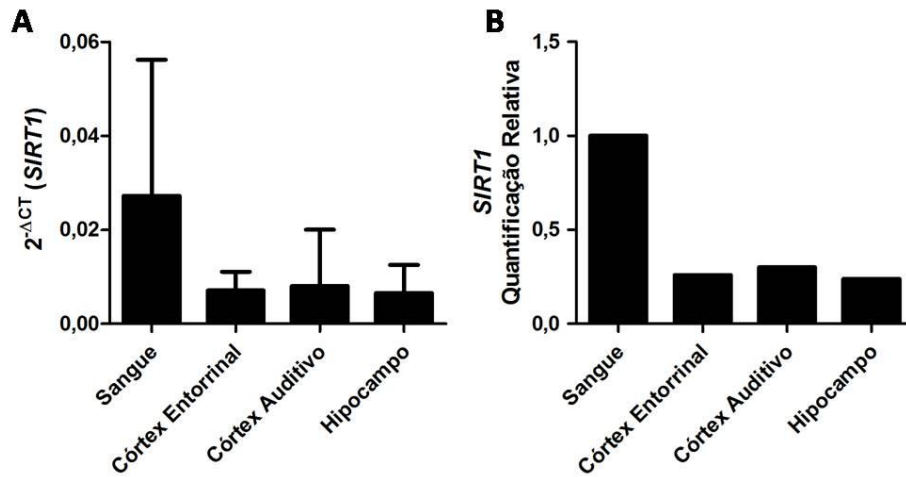


Figura 15: **A)** Comparação dos valores de $2^{-\Delta CT}$ do gene *SIRT1* entre os tecidos sangue, córtex entorrinal, córtex auditivo e hipocampo no grupo de pacientes com Doença de Alzheimer. **B)** Quantificação Relativa (QR) do gene *SIRT1* nas três regiões cerebrais, utilizando os leucócitos de sangue periférico como referência (QR=1) no grupo de pacientes com Doença de Alzheimer.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

5.1 Gene *LR11*

LR11 é uma proteína mosaica, que faz parte de uma família de receptores de lipoproteína de baixa densidade, é principalmente expressa no SNC, mas também pode ser detectada em outros tecidos não-neuronais. Foi relatada *upregulation* da expressão deste gene durante a proliferação celular e é sugerido que, além de participar no desenvolvimento, este gene possa atuar também em eventos patológicos (Jacobsen et al, 2002).

O presente estudo detectou que, em leucócitos de sangue periférico, o gene *LR11* não apresentou diferença de expressão entre o grupo de idosos saudáveis e pacientes com DA, porém ambos os grupos apresentaram expressão cerca de três vezes maior do que no grupo de jovens (Figura 8B). Logo, *LR11* poderia atuar como um possível marcador sistêmico do processo de envelhecimento.

Contraditoriamente aos nossos achados, porém, uma associação entre baixos níveis de transcritos de *LR11* e DA foi descrita em dois estudos de expressão gênica por *microarray* em linfoblastos (Scherzer et al, 2004).

LR11 tem sido investigado como gene candidato para a DA e alguns estudos têm demonstrado a perda da expressão desse gene em tecido cerebral de pacientes com a doença (Scherzer et al, 2004; Offe et al, 2006; Rogueva et al, 2007; Gear et al, 2009).

Em relação às três regiões cerebrais, nossos resultados não encontraram diferença de expressão de *LR11* em cérebro de pacientes com DA e idosos saudáveis, corroborando os resultados observados na análise de RNAm em córtex pré-frontal em um diferente estudo (Alachkar et al, 2008). Esses dados indicam que a expressão de *LR11* neuronal pode não estar associada à DA, uma vez que a redução da sua expressão não foi observada em todos os casos da doença e que, em casos de DA familiar causada por mutação em *PSEN1*, a expressão de *LR11* encontrava-se normal (Mayeux, Hyslop, 2008).

Além disso, nosso estudo comparou a expressão de *LR11* entre leucócitos de sangue periférico e as três regiões cerebrais estudadas. Tanto em relação ao grupo de idosos saudáveis quanto ao grupo de pacientes com DA, as regiões cerebrais apresentaram menor expressão desse gene quando comparadas aos leucócitos de sangue periférico, indicando que *LR11* é muito mais expresso no tecido sanguíneo em relação ao tecido cerebral. Todas as regiões cerebrais analisadas apresentaram uma expressão que variou de 12 a 24% do total da expressão observada no tecido sanguíneo (Figura 9B e 10B). Ao nosso conhecimento, não há relatos na literatura que compararam a expressão de *LR11* em tecido sanguíneo e cerebral.

Devido à diferença de expressão observada entre os tecidos, o sangue periférico não pode ser considerado um marcador sistêmico capaz de representar a expressão deste gene no cérebro.

5.2 Gene *SNAP25*

SNAP25 é uma proteína de membrana plasmática pré-sináptica que possui um importante papel no acoplamento e na fusão da vesícula sináptica. A expressão do gene *SNAP25* e sua distribuição são fortemente reguladas (Cai et al, 2008).

Nosso estudo não detectou expressão do gene *SNAP25* em leucócitos de sangue periférico de jovens, idosos saudáveis e pacientes com DA pela metodologia de qRT-PCR. Embora *SNAP25* seja uma proteína sináptica, sua expressão já havia sido descrita em outros tecidos além do cérebro, como células parietais gástricas (Peng et al, 1997), células β pancreáticas (Nagamatsu et al, 1999), plaquetas (Redondo et al, 2004) e músculo esquelético (Ma et al, 2005). Ao nosso conhecimento, a expressão em leucócitos periféricos nunca havia sido avaliada e este foi o primeiro estudo a demonstrar a ausência de expressão deste gene nestas células.

Nas análises de tecido cerebral, no grupo de idosos saudáveis foi observado que o córtex entorrinal e o hipocampo não apresentaram diferença de expressão, porém, ambos apresentaram uma menor expressão de *SNAP25* em relação ao córtex auditivo (Figura 11B). Segundo Cai e colaboradores (2008), *SNAP25* é diferencialmente expresso em diversas subpopulações neuronais do sistema nervoso

de mamíferos (Cai et al, 2008). Esta expressão é variável entre diferentes terminações axonais, sendo que a proteína não está uniformemente presente em todas as populações neuronais. Estas observações foram feitas tanto no SNC quanto no periférico, sugerindo que a expressão de *SNAP25* está relacionada a vias de transmissão específicas (Garbelli et al, 2008). Esta heterogeneidade de expressão descrita nos terminais axonais de diferentes localizações pode explicar as diferenças na expressão de *SNAP25* entre as três regiões cerebrais no grupo de idosos saudáveis.

Em relação aos pacientes com DA, não detectamos diferença de expressão entre as três regiões cerebrais analisadas como foi observada no grupo de idosos saudáveis. Estes resultados sugerem que a neurodegeneração que ocorre no cérebro destes pacientes poderia mascarar o efeito diferencial da expressão do gene *SNAP25* entre regiões cerebrais distintas.

Estudos têm demonstrado que o declínio cognitivo observado na DA é causado por perda sináptica no córtex de pacientes com DA (Shimohama et al, 1997), logo, os níveis reduzidos de *SNAP25* em pacientes com DA poderiam refletir perda neuronal (Greber et al, 1999).

Nosso estudo detectou uma diminuição significativa na expressão do gene *SNAP25* nas três regiões cerebrais estudadas de pacientes com DA em relação ao grupo de idosos saudáveis, o que poderia refletir uma perda neuronal secundária à doença e um déficit na sinaptogênese.

Esses achados confirmaram dados semelhantes de um estudo que mostrou redução dos níveis da proteína *SNAP25* nas regiões cerebrais do córtex frontal, parietal, temporal, occipital e cerebelo em pacientes com DA, em relação às mesmas regiões cerebrais de um grupo controle (Greber et al, 1999). Da mesma forma, uma análise de *microarray* no neocórtex de pacientes com DA, identificou diminuição na expressão de diversos genes relacionados a funções sinápticas, incluindo o gene *SNAP25* (Tan et al, 2010).

A região cerebral mais afetada em pacientes com DA no nosso estudo foi o hipocampo, apresentando 34% do total da expressão deste gene, seguido pelos córtices auditivo e entorrinal, que apresentaram 37% e 39%, respectivamente, da

expressão gênica observada nas mesmas regiões em idosos saudáveis (Figura 12B). Em pacientes com DA, os neurônios se degeneram em regiões cerebrais específicas, principalmente no hipocampo e no córtex entorrinal, os quais acompanham a formação das placas neuríticas e dosovelos neurofibrilares, que são as evidências mais características da DA. O hipocampo possui um papel fundamental na memória e na disfunção cognitiva precoce observada na DA e a principal aferência do hipocampo origina-se no córtex entorrinal, sendo que ambas as áreas exibem grave perda neuronal na DA (Sze et al, 2000), corroborando nossos achados.

Os mecanismos celulares e moleculares de memória e aprendizagem dependem da função sináptica no hipocampo (Sze et al, 2000). Uma vez que essa é uma das principais regiões afetadas na DA e que muitos elementos do sistema límbico, incluindo o hipocampo, são enriquecidos pelo RNAm de *SNAP25* (Oyler et al, 1989), a diminuição na expressão de *SNAP25* desta área poderia sugerir uma desregulação na função sináptica e na neurotransmissão/neuromodulação observadas na DA.

Pouco se sabe sobre os efeitos que a DA causa sobre o córtex auditivo e este estudo demonstrou que esta região é tão afetada quanto o córtex entorrinal e o hipocampo. Portanto, é possível que outras regiões, além das analisadas neste estudo sejam igualmente comprometidas.

Uma vez que a expressão de *SNAP25* não foi detectada em leucócitos de sangue periférico, não foi possível utilizá-lo como biomarcador preditivo para a DA nesse tecido. Os resultados encontrados, entretanto, possuem relevância biológica e são úteis para permitir uma melhor compreensão das disfunções sinápticas associadas à DA.

5.3 Gene *SIRT1*

As sirtuínas pertencem a uma família de proteínas que possuem uma série de efeitos pleiotrópicos que foram conservados através do processo evolutivo desde bactérias até seres humanos. Além das histonas, *SIRT1* também desacetila vários fatores de transcrição e cofatores que controlam inúmeros processos biológicos diferentes (Ramadori et al, 2008). O papel de *SIRT1* em doenças relacionadas ao envelhecimento está associado ao efeito desses diferentes substratos (Tabela 7) em

vários órgãos, que regulam processos como carcinogênese, metástase, homeostase metabólica, efeitos antiinflamatórios, tônus vascular, funções cardíacas, de neuroproteção e outras (Zeng et al, 2009).

Tabela 7: Substratos de SIRT1 e seus principais efeitos em doenças associadas ao envelhecimento. Modificado de Zeng et al, 2009.

Substrato	Grupo	Principais efeitos
Ku70	+	Atividade de reparo do DNA / supressão da apoptose
hTERT	-	Supressão do crescimento tumoral
p53	-	Inibição de apoptose dependente de p53
FOXO-3	+/-	Resistência ao estresse / Redução da apoptose
NF-κB	-	Promoção da carcinogênese
FOXO-1	+/-	Metástase / carcinogênese
PGC-1α	+	Promoção da gliconeogênese
IRS-2	+	Regulação das vias de sinalização da insulina
UCP-2	-	Aumento da secreção de insulina pelo pâncreas
LXR	+	Promoção da síntese de HDL
eNOS	+	Regulação de óxido nítrico e tônus vascular
PARP	-	Proteção das miócitos cardíacos em parada cardíaca

+ Regulação positiva; - Regulação negativa; hTERT: *human telomerase reverse transcriptase*; FOXO: *forkhead transcription factor*; NF-κB: *nuclear factor - kappa B*; PGC-1α: *peroxisome proliferator activated receptor γ co-activator 1α*; IRS-2: *insulin receptor substrate 2*; UCP-2: *uncoupling protein-2*; LXR: *liver X receptors*; HDL: *high density lipoprotein*; eNOS: *endothelial nitric oxide synthase*; PARP: *poly (ADP-ribose) polymerase*.

O gene *SIRT1* não apresentou diferença de expressão em leucócitos de sangue periférico entre o grupo de jovens, idosos saudáveis e pacientes com DA, não sendo um indicador de envelhecimento, nem de DA. Logo, *SIRT1* não apresentou potencial uso como biomarcador no tecido sanguíneo.

Por outro lado, esse gene apresentou mais do que o dobro da expressão em todas as regiões de tecido cerebral analisadas (córtices entorrinal e auditivo e hipocampo), no grupo de pacientes com DA quando comparadas com as mesmas regiões no grupo de idosos saudáveis (Figura 13B).

Nossos achados não corroboraram estudos da literatura que indicaram *SIRT1* como protetor contra a degeneração axonal e doenças neurodegenerativas

(Ramadori et al, 2008) e observam diminuição da sua expressão em pacientes com DA (Julien et al, 2009).

Por outro lado, um estudo de *microarray* que investigou alterações precoces e temporais da expressão gênica no córtex pré-frontal associada à neuropatologia da DA observou uma diminuição da expressão de *SIRT1* em controles, seguido de um aumento em estágios de déficit cognitivo leve e um aumento ainda mais elevado em pacientes com DA (Bossers et al, 2010).

Neste estudo, além do *SIRT1*, uma série de outros genes apresentou o mesmo padrão de expressão, principalmente genes envolvidos em processos de diferenciação, desenvolvimento e inflamação. Esta diminuição da expressão gênica de *SIRT1* em controles corresponde a uma etapa onde pode ocorrer diminuição da neuroproteção levando a um aumento nos níveis de β A e estresse oxidativo e, posteriormente, acompanha a progressão destes indivíduos até o desenvolvimento da DA. Após o diagnóstico da DA, o gene apresentou aumento de expressão, corroborando os resultados encontrados no presente estudo (Bossers et al, 2010), sugerindo que, de fato, esse seja um mecanismo de compensação nos estágios mais tardios da doença.

Nosso estudo comparou a expressão de *SIRT1* entre leucócitos de sangue periférico e as três regiões cerebrais estudadas. Tanto em relação ao grupo de idosos saudáveis quanto ao grupo de pacientes com DA, as regiões cerebrais apresentaram-se menos expressas quando comparadas aos leucócitos de sangue periférico, indicando que esse gene é mais expresso no tecido sanguíneo do que no tecido cerebral (Figura 14B e 15B). Isso poderia indicar que *SIRT1* possui funções relevantes em tecidos periféricos, como no tecido sanguíneo e outras funções que necessitem de uma menor expressão de *SIRT1* no SNC. Ao nosso conhecimento, não há relatos na literatura que comparam a expressão de *SIRT1* entre tecido sanguíneo e cerebral.

Devido à diferença de expressão observada entre os tecidos, o sangue periférico não pode ser considerado um marcador sistêmico capaz de representar a expressão deste gene no cérebro.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

1. Em relação ao gene *LR11*:

a) Pode ser considerado como um possível marcador de envelhecimento em leucócitos de sangue periférico, uma vez que se apresenta mais expresso nos grupos de idosos com ou sem DA, em relação ao grupo de jovens;

b) A quantificação do seu RNAm não difere em relação às regiões cerebrais de pacientes com DA e idosos saudáveis, impossibilitando sua referência como biomarcador para DA;

c) A expressão cerebral deste gene não se correlacionou com a de leucócitos de sangue periférico, cuja expressão foi maior em relação às regiões cerebrais, não sendo possível utilizá-lo como biomarcador sistêmico da DA.

2. Em relação ao gene *SNAP25*:

a) A ausência de expressão de *SNAP25* em leucócitos de sangue periférico impede sua utilização como biomarcador para envelhecimento ou DA;

b) Em cérebro de idosos saudáveis, a menor expressão observada nas regiões do córtex entorrinal e hipocampo em relação ao córtex auditivo indicam a participação de *SNAP25* em vias de transmissão específicas no envelhecimento;

c) Em cérebro de pacientes com DA, não há diferença de expressão entre as três regiões cerebrais analisadas, sugerindo que a neurodegeneração que ocorre na DA poderia mascarar o efeito diferencial da expressão deste gene entre regiões cerebrais distintas;

d) O decréscimo de sua expressão em regiões cerebrais na DA em relação aos idosos saudáveis sugere disfunção sináptica e de neurotransmissão em estágios tardios da doença.

3. Em relação ao gene *SIRT1*:

-
- a)** A maior expressão de *SIRT1* em regiões cerebrais de pacientes com DA, em comparação aos idosos saudáveis, indica possível mecanismo de compensação em estágios tardios da doença;
- b)** Sua expressão em leucócitos de sangue periférico semelhante entre idosos com e sem DA e jovens impede sua referência como biomarcador para envelhecimento ou DA neste tecido;
- c)** A expressão cerebral deste gene não se correlacionou com a de leucócitos de sangue periférico, cuja expressão foi maior em relação às regiões cerebrais, não sendo possível utilizá-lo como biomarcador sistêmico da DA.
- 4.** Nossos resultados apresentaram potenciais marcadores para o envelhecimento e DA em leucócitos de sangue periférico e tecido cerebral, além de permitir uma melhor compreensão fisiopatológica dos genes *LR11*, *SNAP25* e *SIRT1* nesses processos.
-

ANEXOS

7 ANEXOS**ANEXO 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP
Escola Paulista de Medicina - EPM

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Análise quantitativa da metilação do DNA e expressão de genes
relevantes à Doença de Alzheimer

As seguintes informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo. A sua participação nesse estudo será muito importante para entendermos a relação dos genes *LR11*, *SNAP25* e *SIRT1*, com a Doença de Alzheimer.

A Disciplina de Genética do Departamento de Morfologia e Genética, em colaboração com a Disciplina de Geriatria do Departamento de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e com a Disciplina de Genética da Faculdade de Medicina de Marília (FAMEMA), está desenvolvendo uma pesquisa para a identificação de alterações epigenéticas associadas à Doença de Alzheimer, ou seja, alterações que não envolvem a sequência de DNA. Esse estudo permitirá conhecer melhor os mecanismos desse processo e, conseqüentemente, oferecerá novas possibilidades terapêuticas.

Para essa análise, uma enfermeira treinada coletará 5 mL (cinco mililitros) de sangue por punção periférica da veia do antebraço, em tubo estéril contendo EDTA. O DNA e o RNA serão extraídos a partir dessa amostra e o DNA será submetido à técnica de bissulfito em laboratório especializado. Havendo armazenamento do material para pesquisas futuras, a utilização deste material só será realizada após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

Os desconfortos que o Sr.(a) poderá apresentar estão mais frequentemente relacionados com o local da punção, tais como dor e eritema e sintomas sistêmicos, como tontura e cefaléia. Qualquer anormalidade, que porventura venha a ocorrer, será prontamente atendida, sem ônus financeiro, pela equipe do Centro de Estudos do Envelhecimento.

O Sr.(a) não terá qualquer custo com exames e consultas realizadas. Também não haverá compensação financeira pela sua participação. Os resultados estarão a sua disposição a qualquer momento e será garantido o sigilo dessas informações.

Em qualquer etapa, o Sr.(a) poderá esclarecer dúvidas com a equipe de estudo (MSc. Patrícia Natália Oliveira da Silva – Rua Botucatu, 740 – tel.: 5576-4260) ou com o Comitê de Ética em Pesquisa (Rua Botucatu, 572 – 1º andar – conjunto 14 – tel.: 5571-1062 ou FAX: 5539-7162). Neste projeto, a investigadora principal é Tatiane Katsue Furuya, que pode ser

encontrada na Rua Botucatu, 740 – tel.: 5576-4260. Se o Sr.(a) decidir, a qualquer momento, deixar de participar do estudo, não haverá prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito do estudo descrevendo “Análise quantitativa da metilação do DNA e expressão de genes relevantes à Doença de Alzheimer”. Eu discuti com a pesquisadora Tatiane Katsue Furuya sobre minha decisão em participar do estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário.

Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou em meu benefício nesse Serviço.

Nome do paciente

_____ Data ___/___/___

Assinatura do participante / representante legal

_____ Data ___/___/___

Assinatura da testemunha

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para participação nesse estudo.

_____ Data ___/___/___

Assinatura do responsável pelo estudo

ANEXO 2: Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (UNIFESP)

Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 6 de março de 2009.
CEP 1944/08

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) TATIANE KATSUE FURUYA
Co-Investigadores: Patrícia Natália Oliveira da Silva, Spencer Luiz Marques Payão, Marília de Arruda Cardoso Smith (orientadora)
Disciplina/Departamento: Genética Humana/Morfologia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo
Patrocinador: Recursos Próprios.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: “**Análise quantitativa da metilação do DNA e expressão de genes relevantes à doença de Alzheimer**”.

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Intervenção diagnóstica.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Sem risco, desconforto leve, envolvendo coleta de sangue.

OBJETIVOS: Avaliar o padrão e a frequência de metilação dos promotores dos genes: LR11, SNAP25 e SIRT1 no envelhecimento e na doença de Alzheimer (DA), em linfócitos e em tecido cerebral. Correlacionar o padrão de metilação dos genes LR11, SNAP25 e SIRT1 com os resultados da análise quantitativa da expressão dos 3 genes no envelhecimento e na DA, em linfócitos e tecido cerebral. Identificar marcadores genéticos no sangue e me tecido cerebral que poderão potencialmente subsidiar diagnóstico, prognóstico e terapia na DA.

RESUMO: Serão estudados 3 genes, LR11, SNAP25 e SIRT1, que foram selecionados devido à sua participação em funções como transporte e processamento de APP/amiloidogênese, transmissão sináptica e neuroproteção relevantes à DA, conforme observado em estudos de proteômica e microarray. Serão coletados 5 mL de sangue periférico de aproximadamente 50 pacientes com DA, de ambos os sexos, de 50 idosos saudáveis, 50 jovens saudáveis, além de amostras de cérebro de 10 pacientes com DA e de 10 idosos saudáveis. Serão estudados somente pacientes que apresentarem um mínimo de 3 anos de evolução da DA, os quais serão selecionados quanto à forma esporádica de acometimento tardio no Ambulatório de Neurologia do Comportamento da UNIFESP. As amostras de tecido cerebral serão oriundas do córtex e do cerebelo, respectivamente região envolvida e não envolvida na DA, obtidas por autópsia e congeladas a -80°C. Serão coletadas 10 amostras de cérebro de pacientes com DA e 10 de idosos saudáveis, a serem disponibilizadas pelo "The Brain Bank- Douglas Hospital Research Centre- Montreal Quebec- Canadá". As amostras de cérebro serão descongeladas, sendo parte destinada à técnica de extração de RNA e parte à extração de DNA. Será realizada análise de metilação de DNA por PCR real time.

FUNDAMENTOS E RACIONAL: Estudos moleculares da DA permitiram a identificação de alguns genes responsáveis pela doença, entre eles o gene da substância precursora da proteína B-amilóide (APP). Estudos recentes relacionaram eventos epigenéticos à regulação de genes da DA, como os genes da APP edas alfa, beta e gama secretases, que participam do processamento de B-amilóide. Este projeto visa avaliar os padrões de metilação



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

e expressão de 3 genes relacionados ao transporte e processamento de APP/amiloidogênese, transmissão sináptica e neuroproteção..

MATERIAL E MÉTODO: Descritos os procedimentos que serão realizados.

TCLE: Apresentado adequadamente, de acordo com a res 196/96.

DETALHAMENTO FINANCEIRO: CAPES, CNPq, FAPESP.

CRONOGRAMA: 24 meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: Mestrado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: **01/03/10 e 01/03/11.**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU e APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

1944/08