

LUIZ CARLOS DE OLIVEIRA JÚNIOR

IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS MIMÉTICOS A AUTOANTÍGENOS POR PHAGE  
DISPLAY NA DOENÇA DE ALZHEIMER

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira  
Coorientadora: Dr<sup>a</sup>. Fabiana de Almeida Araújo Santos

UBERLÂNDIA

2012

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

**Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.**

---

O48i

2012 Oliveira Júnior, Luiz Carlos de, 1979-  
Identificação de peptídeos miméticos a autoantígenos por phage  
display na Doença de Alzheimer / Luiz Carlos de Oliveira Júnior. --  
2012.  
71 f.

Orientador: Carlos Ueira Vieira.

Coorientadora: Fabiana de Almeida Araújo Santos.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Inclui bibliografia.

.. Ciências médicas - Teses. 2. Alzheimer, Doença de -  
Teses. I. Vieira, Carlos Ueira, 1981- . II. Santos, Fabiana de  
Almeida Araújo, 1983- . III. Universidade Federal de Uberlândia.  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

---

**CDU: 61**

LUIZ CARLOS DE OLIVEIRA JÚNIOR

IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS MIMÉTICOS A AUTOANTÍGENOS POR PHAGE  
DISPLAY NA DOENÇA DE ALZHEIMER

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde.

Uberlândia, 24 de fevereiro de 2012

Banca Examinadora

---

Prof. Dr. Fernando Silva Neves - UFMG

---

Prof. Dra. Yara Cristina de Paiva Maia - UFU

---

Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira - UFU

Ao meu pai,  
por tudo que me ensinou e por tudo que me deu condições de aprender.

## AGRADECIMENTOS

A Naiana, minha esposa, pelo companheirismo e incentivo, doçura e firmeza que me sustentaram nas horas de dificuldade. Nos seus olhos "cor de Supernova" minhas inquietações tem descanso, nos seus braços minhas dúvidas tem amparo.

À minha irmãzinha Gisele e ao grande irmão Edson por estarem sempre ao meu lado nesses momentos importantes da minha vida.

Ao Luiz David, por ter estado ao meu lado nas "idas e vindas" do meu caminho (ou caminhos).

Devo a você ter iniciado e persistido nesse projeto.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Ueira, pela paciência e confiança mas sobretudo pelo respeito. Obrigado por me deixar fazer perguntas e levá-las a sério. Temos ainda muitas perguntas a serem respondidas e outras tantas por fazer.

À minha querida coorientadora, Dr<sup>a</sup>. Fabiana, que ocupou o cargo de meu Anjo da Guarda. Não é possível agradecê-la por tudo o que fez, pelas orientações e dicas, pela amizade, carinho, pela energia boa e doação (estou tentando a vários meses agradecer e ainda não consigo achar suficiente).

Ao Prof. Dr. Luiz Ricardo, pela oportunidade de estar com as pessoas maravilhosas que estudam e trabalham nesse laboratório.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Yara Cristina de Paiva Maia, pelo carinho e por suas sábias sugestões.

Ao Prof. Dr. Carlos Henrique Rezende, pela amizade e exemplo. Um grande professor a gente nunca esquece.

À Maria Moura, minha doida amiga, pela disponibilidade em avaliar os pacientes do Ambulatório de Demência, e por estar ao meu lado naqueles dias de intenso trabalho.

À sempre elegante Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Sheila, por ter dado a ideia do serviço de demência e ajudado a levar o projeto adiante. Aprendi muito sobre como ser médico observando seu jeito atencioso e delicado de tratar todas as pessoas.

Às queridas Ana e Leila, as supersecretárias do Serviço de Psiquiatria, que me acompanharam nessas loucuras acadêmicas, dando todo apoio... apoio que a gente só recebe de mãe.

À Dona Graça (que Graça), Fabiana, Rone, Jeú, Roberto e toda equipe de enfermagem pelo grande carinho e colaboração nesses anos todos.

Aos meus queridos colegas (na época, residentes), Patrícia, Eline, Gustavo, Sérgio, Manoela e Melissa, por terem colaborado com o funcionamento do ambulatório, por serem um estímulo que me leva a aprender mais... afinal tinha que descobrir as mais diabólicas perguntas para fazer e os mais terríveis temas sobre os quais os senhores teriam que dar aula, encontrar os artigos mais doidos que só seriam publicados no mês seguinte (assim vocês estariam à frente do tempo), e fazê-los estudar tudo que ia ser falado no congresso. Saudades da residência?

À minha querida amiga Martha, que me apoiou, me ouviu, me puxou a orelha e não me deixou cair diante das descrenças que sempre rondaram o nosso trabalho (você sabe quais...).

À Ângela, Patrícia, Paula, Tamiris, Taíse, Elisia, Emília, Lara, Carol(s) e todas as meninas Superpoderosas do NANOs, pela amizade e carinho com que sempre me receberam.

Aos meus queridos companheiros de mestrado: Lea e Sérgio. Juntos enfrentamos uma jornada cinematográfica para chegar ao fim de tudo isso. Alguns episódios do *Lost* aconteceram, o *Titanic* afundou, mas resistimos bem como se fossemos o Último Samurai. No fim, o final foi feliz.

À todos os pacientes e seus familiares por terem participado desse projeto, por terem paciência comigo naquele ambulatório lotado... por terem partilhado um pouco da suas histórias comigo.

À UFU, minha escola, ao CNPQ e CAPES por terem oferecido a estrutura e  
financiamento para a realização desse trabalho.

À Pós-Graduação em Ciências da Saúde pela confiança e oportunidade de buscar essa conquista.

E à Gisele pela eterna paciência...

Ao Hospital de Clínicas de Uberlândia, ao Serviço de Psiquiatria e Psicologia Médica e à  
FAMED por permitirem o funcionamento do nosso ambulatório e a realização dessa pesquisa.

À alguém que eu deva ter esquecido, por que sempre esqueço alguma coisa ... meu muito  
obrigado mesmo que eu tenha falhado em me lembrar de você.

E, a Deus...

por ter feito o vento soprar quando o barco parava...  
por ter me dado estrelas que me guiassem quando me senti perdido...  
por ter feito a brisa refrescar o suor quando foi preciso remar...  
por ter me dado amigos quando cansei e quase larguei os remos...  
por ter feito a terra aparecer quando o barco já afundava...  
por ter me mostrado que havia menos água entrando no barco do que eu achava...  
enfim, por ter me provado que tudo é pequeno diante da história que estamos escrevendo.

Amém!

A fé é um modo de possuir desde agora  
o que se espera, um meio de conhecer  
realidades que não se veem.

Hb11,1

## RESUMO

A Doença de Alzheimer (DA) é a causa mais importante de demência no mundo. O envolvimento do sistema imunológico no processo patogênico tem sido demonstrado em diversos estudos inclusive com a descrição de autoanticorpos (AAcs) presentes no soro dirigidos a alvos no sistema nervoso central. Não é possível definir ainda qual a sua participação exata na DA. Neste estudo, utilizando a metodologia do *Phage Display* procuramos identificar AAcs específicos de pacientes com a doença e caracterizar seus antígenos utilizando ferramentas de bioinformática. Foram selecionados 10 pacientes com DA segundo os critérios do DSM-IV TR e NINCDS-ASRDA e 10 controles saudáveis pareados por sexo e idade. Utilizando uma biblioteca de peptídeos expostos em fagos M13, foi realizado *biopanning* selecionando 10 peptídeos reconhecidos por IgGs no soro de pacientes com DA. Os prováveis epítópos foram caracterizados e seu envolvimento com a DA foi avaliado na literatura. Foram encontrados alinhamentos com a Neurexina 3 $\beta$ , PLK4, Neuroserpina, vários membros da família DNAJ, Mint-1/X11, Gene 2 de susceptibilidade para o Autismo, unidades  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3,  $\alpha$ 4 e  $\alpha$ 6 do receptor nicotínico da acetilcolina, Trombospondina-1, TRAF6, ECA, receptor  $\alpha$  3 do GDNF, PRUNE2 e CD44. A tecnologia de *Phage Display*, aliada a ferramentas de bioinformática, demonstrou ser interessante metodologia de investigação de AAcs presentes no soro de pacientes com DA podendo fornecer novas pistas sobre mecanismos da doença e alvos terapêuticos.

Palavras-chave - Alzheimer, Autoanticorpos, *Phage-Display*, Autoimunidade, Neurodegeneração.

## ABSTRACT

Alzheimer's Disease (AD) is the most important cause of dementia in the world. The involvement of the immune system in the pathogenic process has been shown by several studies including the description of autoantibodies (AAc) directed to targets in the central nervous system. It is not possible yet to further define what their exact involvement in AD is. In this study, using the methodology of Phage Display we sought to identify AAc specific to patients with the disease and to characterize their antigens using bioinformatics tools. We selected 10 patients with AD according to DSM-IV-TR and NINCDS ASRDA criteria and 10 healthy controls matched for age and sex. Using a library of peptides displayed on M13 phages, we performed biopanning, thus selecting 10 peptides recognized by IgG in sera from patients with AD. The probable epitopes were characterized and their involvement with AD was assessed in the literature. We found alignment with Neurexin 3 $\beta$ , PLK4, Neuroserpin, DNAJ, Mint-1/X11, units of the nicotinic acetylcholine receptor, Trombospondin-1, TRAF6, ACE, GDNF  $\alpha$ 3 receptor, PRUNE2 and CD44. The *Phage display* technology, combined with bioinformatics tools, has proven to be an interesting research methodology of AAb present in the serum of patients with AD and may provide new insights into disease mechanisms and therapeutic targets.

Keywords - Alzheimer's, Autoantibodies, Phage-Display, Autoimmunity, Neurodegeneration.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
µg	Microgramas
µl	Microlitros
µm	Micrômetro
AAcs	autoanticorpos
Aβ	Peptídeo beta-amilóide
Acs	Anticorpos
Ags	Antígenos
BSA	Soro albumina bovina
CDR	<i>Clinical Dementia Rating</i>
CID-10	Classificação Internacional de Doenças, 10 <sup>a</sup> . Revisão
DA	Doença de Alzheimer
DNA	Acido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
DSM-IV/TR	<i>Diagnostic and Statistic Manual</i> , 4a Edição, Texto Revisado.
DV	Demência Vascular
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
ENF	Emaranhados Neurofibrilares
g	Grama
GDNF	Fator neurotrófico derivado da Glia
IgG	Imunoglobulina G
IPTG	Isopropil b-D-tiogalactoside
kDa	Quilodalton
L	Litro
LB	Meio de cultura Luria-Bertania
M	Molar

PANDAS	<i>Pediatric Autoimmune Neuropsychiatric Disorders Associated with Streptococcal infection</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PhD	<i>Phage Display</i>
PET	Tomografia por emissão de pósitrons
PPA	Proteína Precursora do amilóide
RNM	Ressonância Nuclear Magnética
TBS	Tampão Tris-NaCl
TBS-T	Tampão Tris NaCl com Tween
TNF	Fator de Necrose Tumoral

## LISTA DE AMINOÁCIDOS

A	Alanina
C	Cisteína
D	Ácido Aspártico
E	Ácido Glutâmico
F	Fenilalanina
G	Glicina
H	Histidina
I	Isoleucina
L	Isoleucina
M	Metionina
N	Asparagina
P	Prolina
Q	Glutamina
R	Arginina
S	Serina
T	Treonina
V	Valina
W	Triptofano
Y	Tirosina

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	15
1.1	O Envelhecimento populacional e a transição epidemiológica no Brasil e no Mundo .....	15
1.2	Envelhecimento cerebral normal .....	17
1.3	Demência: definição e epidemiologia .....	18
1.4	Doença de Alzheimer .....	20
1.4.1	História, quadro clínico e neuropatologia .....	20
1.4.2	O peptídeo A $\beta$ e a proteína Tau .....	21
1.4.3	O Sistema Imune e a DA .....	22
1.4.4	Diagnóstico da DA e biomarcadores .....	23
1.5	<i>Phage Display</i> .....	25
2	OBJETIVOS .....	27
3	MATERIAL E MÉTODOS .....	28
3.1	Seleção de pacientes, coleta e processamento inicial das amostras .....	28
3.2	Seleção de peptídeos miméticos a autoanticorpos de Alzheimer ( <i>Biopanning</i> ) .....	29
3.3	Amplificação e purificação de bacteriófagos mimetopos .....	30
3.4	Titulação .....	30
3.5	Extração e sequenciamento do DNA .....	30
3.6	<i>Bead-ELISA: Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay in bead</i> .....	31
3.7	Análise de Bioinformática .....	32
3.8	Análise Estatística .....	33
4	RESULTADOS .....	34
5	DISCUSSÃO .....	47
6	CONCLUSÃO .....	52
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	53
	ANEXO.....	72

## 1 - INTRODUÇÃO

### 1.1 - O Envelhecimento populacional e a transição epidemiológica no Brasil e no Mundo

A estrutura da população mundial tem passado por grandes modificações que tiveram início na Revolução Industrial mas que se acentuaram nas últimas décadas. A principal mudança é um acelerado processo de envelhecimento populacional, algo considerado sem precedentes na história humana e que trás consigo grandes consequências sociais, econômicas e para a gestão dos sistemas de saúde (KINSELLA; VELKOFF, 2001).

Segundo a Organização das Nações Unidas (2010), o número de idosos no mundo triplicou no período entre 1950 e 2010 e deve triplicar novamente até 2050. A população com idade superior a 65 anos atingiu 506 milhões em 2008 mas as projeções indicam que em 2040 será de 1,3 bilhão de pessoas representando 14% da população mundial. Nesse ano, 60 países já terão mais de 2 milhões de idosos em suas populações (KINSELLA; HE, 2009).

O processo de envelhecimento da população mundial começou com a melhoria das condições de vida e redução da mortalidade. Entre as populações ocidentais, por exemplo, ocorreu um acréscimo de 20 anos à expectativa de vida no período de 1900 a 1950. Mas a grande mudança na composição das populações é provocada pela baixa fertilidade que reduz a introdução de crianças e jovens na população. Em alguns países da Europa esse fenômeno tem levado ao declínio de populações (KINSELLA; VELKOFF, 2001).

O envelhecimento populacional não é uniforme em todo o mundo. Nos países desenvolvidos, em especial na Europa e Japão, o processo de envelhecimento é bem acentuado. Metade dos idosos vivem nesses países, aonde tem aumentado a população de idosos com mais de 80 anos e a maior mortalidade masculina tem provocado a feminilização do envelhecimento. Na África e na Ásia isso não acontece e o processo de envelhecimento é menos acentuado. Enquanto a idade mediana da população européia é de 40 anos, a da africana é de 19 anos (UNITED NATIONS - UN, 2010).

No Brasil, a transição demográfica começa em 1940 com marcante declínio da mortalidade infantil e rejuvenescimento populacional. Isso mantém-se até a década de 1960 quando 52% da população estava abaixo de 20 anos e apenas 3% acima de 65 anos (CARVALHO; GARCIA, 2003). A partir de então ocorre declínio da fecundidade. Esse processo

se torna o principal agente do envelhecimento populacional brasileiro. A taxa de fecundidade entre 1970 e 2000 caiu de 5,8 filhos/mulher para 2,3 filhos/mulher, motivado pela urbanização e pela situação econômica nesse período, criando um ritmo de transição muito mais acelerado do que o visto na Europa: o aumento no número de idosos entre 1960 e 2008 foi de 700%. Até 2020 a expectativa de vida ao nascer deverá alcançar 75,5 anos. Em 2030 os idosos já devem representar 13% dos brasileiros (CHAIMOWICZ, 1997; VERAS, 2009).

A transição demográfica é acompanhada pela transição epidemiológica. A urbanização e a industrialização, com seus efeitos sobre a infraestrutura e serviços, produziram redução da mortalidade por infecções e um aumento das doenças crônicas e não transmissíveis. As projeções indicam que gradualmente o quadro atual, em que as infecções respiratórias, diarreias e condições que acometem o período perinatal ocupam o posto de maiores responsáveis pela mortalidade e morbidade em todo o mundo, será substituído em 2020 por um outro em que as doenças cardiovasculares isquêmicas, depressão unipolar e acidentes de trânsito ocuparão esse lugar. Ocorre um deslocamento da mortalidade dos jovens para os idosos além de redução da mortalidade com aumento da morbidade (KINSELLA; PHILLIPS, 2005).

As mudanças do perfil epidemiológico no Brasil também são diferentes devido a existência de assimetrias entre as diversas regiões do país, fazendo conviver padrões diferentes de morbimortalidade: enquanto na região Norte e Nordeste as doenças infecciosas são ainda muito importantes, no Sul ganham destaque as doenças crônico-degenerativas, como o câncer. A reintrodução de doenças infectocontagiosas como malária e dengue produzem uma espécie de contra-transição epidemiológica (PRATA, 1992; SCHRAMM et al,2004).

O envelhecimento é um grande desafio aos modelos de planejamento e gestão, principalmente dos serviços de saúde. Os custos e demandas em saúde aumentam consideravelmente: de um terço a metade dos custos em saúde são direcionados a idosos. No Japão o gasto em saúde com idosos é 4,8 vezes maior que com jovens (ANDERSON; HUSSEY, 2000). No Brasil, o desafio é reorganizar os serviços de saúde, desenhados para o atendimento materno-infantil e doenças infecciosas, para esse novo perfil populacional. Além disso, será necessário formar profissionais envolvidos nos cuidados aos idosos como geriatras e gerontologistas (MOTTA; AGUIAR, 2007; WONG; CARVALHO, 2006).

## 1.2 - Envelhecimento cerebral normal

Neste contexto, em que cada vez mais pessoas envelhecem com boas condições de saúde física, envelhecer com preservação da cognição passa a ser uma preocupação importante para os serviços de assistência à saúde dos idosos e alvo para pesquisas. Um dos principais desafios é compreender o processo de envelhecimento normal e diferenciá-lo de doenças neurodegenerativas como as demências (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2000).

Alterações cognitivas, morfológicas e moleculares são esperadas com o envelhecimento cerebral normal e ocorrem dentro de um padrão característico de perda e preservação. Com o envelhecimento ocorre acúmulo de danos moleculares pelo *stress* oxidativo, alteração dos sistemas de regulação energética celular, alterações da glia e neurodegeneração. Esses danos são compensados por mecanismos de neurogênese, sinaptogênese, produção de proteínas antiapoptóticas, fatores de crescimento neuronal e enzimas antioxidantes (MATTSON; CHAN; DUAN, 2002).

O volume cerebral apresenta redução com a idade a partir dos 30 anos mas ocorre com maior intensidade a partir dos 50 anos de idade. A maior perda ocorre na substância branca e não na cinzenta. Enquanto ocorre redução de 14% do volume de substância cinzenta entre os 30 e os 90 anos, a redução de substância branca neste período é de 26% (GUNNING-DIXON, 2009).

A perda de substância branca também mostra um padrão característico, que se correlaciona com alterações cognitivas próprias do envelhecimento. A atrofia é maior na região dos lobos frontais, estriato e tálamo, o que resulta em pobre performance nos testes de avaliação das funções executivas e menor velocidade de processamento das informações (TISSEURAND; JOLLES, 2003). A alteração da conectividade córtico-subcortical leva a prejuízo da memória de trabalho. As habilidades verbais são preservadas. Também estão protegidos o conhecimento já consolidado e a memória implícita (PARK; REUTER-LORENZ, 2009; RAZ; RODRIGUES, 2006).

A perda neuronal durante o envelhecimento não é tão acentuada como sempre se acreditou. Pode não passar de 10% e é limitada a algumas regiões específicas. Entretanto, ocorrem modificações importantes na morfologia neuronal. Os dendritos diminuem suas ramificações e ocorre redução das espículas. Nos axônios é possível observar inclusões de glicogênio, degeneração mitocondrial e desorganização das estruturas relacionadas ao transporte

axonal. A desmielinização segmentar e descompactação da mielina acabam resultando em lentificação da velocidade de propagação dos impulsos (PANNESE, 2011).

A produção de neurotransmissores e a distribuição de seus receptores também se altera. Os neurônios mais afetados são os dopaminérgicos. Isso tem relação com as alterações das funções executivas, as mais importantes do envelhecimento normal. Ocorre um declínio dos receptores dopaminérgicos D2 nos núcleos caudado, putâmen e no córtex pré-frontal (CARLSSON, 1987; RINNE, 1990; WONG, 1984). O sistema glutamatérgico, fundamental para a plasticidade sináptica e a memória, também é afetado. Ocorre um redução do conteúdo de glutamato no hipocampo e no córtex, além de consistente redução dos receptores NMDA, todos diretamente envolvidos nos processos de plasticidade (SEGOVIA, 2001; LIU, 2004).

### **1.3 - Demências: definição e epidemiologia**

Apesar de ser possível um envelhecimento no qual o idoso conserve grande parte de sua capacidade cognitiva, essa não é a regra. Com a transição epidemiológica também ocorre o aumento da prevalência de doenças neurodegenerativas, entre elas as demências. A incidência e prevalência das demências aumentam consideravelmente com a idade. Apenas 2% dos casos ocorrem antes dos 65 anos de idade (PRINCE, 2007).

Demência é definida como uma síndrome clínica caracterizada pelo comprometimento múltiplo das funções cognitivas como resultado direto de uma doença ou do uso de uma substância. Ocorre um prejuízo importante da memória, com impacto sobre a capacidade de aprender novas informações, e pelo menos uma outra disfunção cognitiva como agnosia, apraxia, afasia e alteração das funções executivas. Entre as doenças que cursam com quadro demencial estão a Doença de Alzheimer (DA), Demência vascular (DV), Doença de Huntington, infecção pelo HIV, Demência de Corpúsculos de Lewy e Doença de Pick (APA, 2002).

A prevalência média de demência varia nas diversas partes do mundo. Na África, a prevalência estimada é de 2,2%, na Ásia 5,5%, na América do Norte 6,4%, na América do Sul 7,1% e na Europa 9,4% (LOPES; BOTINO, 2002). Estudos europeus mostram que a prevalência de demência dobra a cada cinco anos após os 60 anos, indo de aproximadamente 1% entre os 60 e 64 anos, para 32% entre os 90 e 94 anos (HOFMAN, 1991). Nesses estudos, o risco de demência é menor com o aumento da escolaridade, principalmente em mulheres, nas quais o

efeito da idade sobre o aumento da prevalência é mais evidente (HOFMAN, 1991; LETENNEUR, 2000; ROCCA, 1991).

Os estudos em países em desenvolvimento são menos frequentes que nos países desenvolvidos (SCAZUFA, 2002). Os estudos realizados no Brasil, por exemplo, tem metodologias bem distintas impedindo o cálculo da prevalência a partir da reunião de seus dados (FAGUNDES, 2011). Um estudo realizado na cidade de Catanduva, São Paulo, estima a prevalência de demência em 7,1% (HERRERA, 2002).

As projeções apontam aumento importante do número de casos de demência. Com a estimativa de 24,3 milhões de casos no ano 2000 e com a taxa de 4,6 milhões de novos casos por ano, espera-se que em 2040 serão 81,1 milhões de pessoas doentes em todo o mundo. Enquanto nos países desenvolvidos o aumento nesse período será de 100%, na China, Índia e regiões vizinhas, o aumento será de 300% (FERRI, 2005).

O impacto econômico dessas doenças, avaliado por vários estudos, é considerável. O custo médio por paciente com demência na Suécia, Dinamarca, Noruega e Finlândia, foi estimado em 21.260 dólares por ano. O maior fator na composição do custo foi o gasto com cuidadores, que tende a aumentar com o declínio cognitivo (JONSSON, 2006). Estima-se que o custo anual das demências em toda a Europa chegue a 105,2 bilhões de Euros. (OLESEN, 2012).

Entre as diversas causas de demência a DA é a mais prevalente em todo o mundo, seguida pela DV. De 31,3% a 72% dos casos de demência são causados pela DA (BACHMAN, 1992; BRUNNSTRON, 2009; OTT, 1995; STEVENS, 2002). Nos EUA 4,5 milhões de pessoas apresentavam DA no ano 2000 . As projeções são de que em 2050 esse número cresça para 13,2 milhões (HERBERT, 2003). Na China a prevalência de DA na população acima de 65 anos é de 4,8% enquanto que a de DV é 1,1%, semelhante ao que é visto nos países ocidentais (ZHANG, 2005). Para o Brasil, a prevalência de DA nesta população é de 4,9% (HERRERA, 2002).

## 1.4 - Doença de Alzheimer

### 1.4.1 - História, quadro clínico e neuropatologia

Em 1906, durante o 37º encontro dos Psiquiatras do Sudoeste da Alemanha, o psiquiatra Alois Alzheimer apresentou a descrição clínica e anatomo-patológica de um caso de demência pré-senil. A paciente era Auguste Deter, morta em abril de 1906. Ela havia sido paciente de Alzheimer enquanto ele trabalhava em Frankfurt, em 1901. Era uma mulher de 51 anos que, nos oito meses anteriores, ,u profundas modificações da personalidade. Demonstrava ciúme delirante do esposo, perda da capacidade de interação social e de formar novas memórias, desorientação temporal e fala incompreensível. Em seu relato, publicado em 1907, Alzheimer descreve, além do quadro clínico, o achado de placas de aspecto amiloide e emaranhados neurofibrilares (JELLINGER, 2006; GOEDERT; GHETTI, 2007; CIPRIANI, 2011).

A descrição de Alzheimer, entretanto, não chama a atenção da comunidade científica. Foi somente com a publicação da oitava edição do Tratado de Psiquiatria de Kraepelin, em 1915, que a doença passou a ser reconhecida pelo epônimo de "Demência de Alzheimer". Na época, o termo era usado apenas para demências pré-senis (GOEDERT; GHETTI, 2007). Posteriormente o termo Doença de Alzheimer passou a nomear tanto as demências senis quanto pré-senis com as características neuropatológicas e clínicas semelhantes àquelas descritas originalmente (AMADUCCI, 1986).

O quadro clínico da DA é caracterizado pelo desenvolvimento de alterações da memória, com incapacidade de aprendizado, deterioração da linguagem (afasia), das habilidades motoras (apraxia) e da percepção (agnosia), com início entre os 40 e 90 anos, mais tipicamente após os 60 anos de idade (APA, 2002; MCKHANN, 1984). Algumas alterações cognitivas, principalmente um acentuado declínio das memórias de trabalho e semântica, precedem o diagnóstico em torno de 5 a 12 anos (AMIEVA, 2008; BOWLER, 1997; WILSON, 2011).

Sintomas psiquiátricos são frequentes e recorrentes (LEVY, 1996). Depressão, isolamento social e ideação suicida ocorrem em 72% dos pacientes em um período de 2 anos antes do diagnóstico. Alucinações, delírios e outros sintomas psicóticos já ocorrem em 45% dos pacientes no diagnóstico, sendo bem mais frequentes em mulheres e associando-se a pior evolução cognitiva (JOST, 1996). Sintomas neurológicos podem aparecer tardeamente na

evolução. Mioclonia, dispraxia de membros e lentificação da marcha surgem em torno de 4 a 6 anos após o diagnóstico. Crises convulsivas também são relatadas (GOLDBOLT, 2004).

A atrofia cerebral é outro sinal clínico que tem início antes do diagnóstico da DA. Enquanto no envelhecimento normal ocorre atrofia cerebral de 0,2 a 0,5% ao ano, na DA ela ocorre de 2 a 3% ao ano. A atrofia é global, afetando tanto córtex quanto substância branca, com alguma seletividade para os lobos temporais mediais, córtex entorrinal, hipocampo e amígdala (DE LA MONDE, 1989; FOX; SCHOTT, 2004; JACK, 1998).

Os achados neuropatológicos característicos da doença são as placas de amiloide e os emaranhados neurofibrilares (ENF). As placas de amiloide, ou placas senis, são depósitos extracelulares do peptídeo A $\beta$ , derivado da clivagem da Proteína Precursora do Amiloide (PPA). As placas do tipo fibrilar, associadas a neuritos distróficos e reação da micróglia, estão ligadas a perda neuronal e são encontrados no cérebro dos pacientes com DA com maior frequência do que placas difusas de amiloide não fibrilar e sem reação da glia, muito frequentes nos indivíduos sem alterações cognitivas. Já os emaranhados neurofibrilares são agregados intracelulares de proteína Tau hiperfosforilada que, após a morte do neurônio, se tornam extracelulares. A formação dos emaranhados segue um padrão temporal característico que serve para estadiamento da doença (SERRANO-POZZO et al., 2011).

#### **1.4.2 - O peptídeo A $\beta$ e a proteína Tau**

O peptídeo A $\beta$  é considerado o mais importante agente envolvido no desenvolvimento da DA. Ele é o principal constituinte da placa senil, marcador histopatológico da doença. Esse peptídeo é derivado da clivagem enzimática da PPA pelas enzimas  $\beta$ -secretase e  $\gamma$ -secretase (SELKOE, 2001). Sua produção é resultado da atividade normal dos neurônios e parece ser parte de um processo de regulação da atividade excitatória (ESTEBAN, 2004).

A ação do A $\beta$  na doença de Alzheimer não se limita apenas à formação dos depósitos de amiloide. Evidências sugerem várias outras alterações provocadas pelo peptídeo em neurônios. O A $\beta$  atua sobre os receptores nicotínicos de acetilcolina e bloqueia o potencial de ação nos neurônios. Isso reduz o número e a plasticidade das sinapses (WEI et al, 2009). Oligômeros formados pelo A $\beta$  provocam a internalização do receptores de insulina neuronais, alterando os mecanismos de plasticidade e provocando perda sináptica (DE FELICE et al., 2009). O A $\beta$

intracelular também produz alterações estruturais com impacto sobre o transporte axonal e provocando a ativação de fatores apoptóticos (LI et al., 2007).

O outro marcador neuropatológico da doença é a presença de ENF de proteínas Tau. Essas proteínas são associadas aos microtúbulos e constituem o citoesqueleto dos neurônios (TAKASHIMA, 2010). Na DA, depósitos dessa proteína hiperfosforilada são encontrados principalmente em neurônios de projeção dos núcleos colinérgicos (VANA et al., 2011). A formação dos emaranhados pode ser influenciada diretamente pelo A $\beta$ . Estudos demonstram que o A $\beta$  ativa as Caspases, enzimas com ação de proteases, que clivam as proteínas Tau gerando fragmentos truncados que facilmente se organizam nas fibrilas e filamentos que formam os ENF (GAMBLIN et al., 2003; RISSMAN et al., 2004).

#### **1.4.3 - O Sistema Imune e a DA**

Desde a descrição original das placas senis, sabe-se que um processo inflamatório acompanha a deposição do A $\beta$  e desempenha um papel importante na progressão da doença (HENEKA et al., 2010a). A micróglia, os macrófagos residentes do sistemas nervoso central, é ativada pelo A $\beta$  e produz fatores inflamatórios como interleucinas 1 e 6 ( HENEKA et al, 2010b; KHANDELWAL et al. 2011).

Além da resposta imune inata, a resposta adaptativa parece estar relacionada com a patogênese da DA. O envolvimento de anticorpos (Ac) é reconhecido em várias outras doenças neuropsiquiátricas como o Transtorno Obsessivo Compulsivo, Síndrome de Guillain Barré e Miastenia Gravis. Sua participação pode se dar por meio da atuação como agonistas e antagonistas de receptores ou até mesmo modificando a densidade deles na superfície celular (DIAMOND et a., 2009).

Vários estudos tem demonstrado que, apesar de o sistema nervoso ser uma região de relativo isolamento imunológico pela barreira hematoencefálica, inúmeros Acs contra alvos neuronais podem ser detectados no líquor e soro de pacientes com DA e até mesmo em idosos saudáveis e jovens (LEVIN et al., 2010). Aumento de Acs oligoclonais no líquor mas não no soro dos pacientes com DA indicam que a produção dos Acs pode ocorrer dentro do sistema nervoso (BOURAS et al., 2005). Estudos com *microarrays* para imunoglobulinas tem

identificado grande variedade de Acs contra alvos neurais e alguns demonstraram ter potencial para serem utilizados em métodos diagnósticos (NAGELE et al., 2011).

O papel desses autoanticorpos (AAcs) na fisiopatologia da doença ainda não é claro, podendo contribuir ou não para o processo neurodegenerativo (COLASANTI et al., 2010). Os Acs contra A $\beta$  podem impedir a agregação do peptídeo e a formação de fibrilas e placas senis (DODEL et al., 2011; NEFF et al., 2008). Nos pacientes em que a presença de anti-A $\beta$  é maior nas placas de amiloide, o impacto da doença parece ser menor (KELLNER et al., 2009). Eles podem ser produzidos para exercer um papel modulador na neurodegeneração ou serem apenas o resultado do reconhecimento de neoepítópos formados pela conformação dos peptídeos ou sua modificação por glicosilação ou produtos da peroxidação de lipídeos (PAUL et al., 2010). Testando o efeito do epítopo reconhecido pelo anticorpo, alguns autores demonstraram que anti-A $\beta$  que se liga a região N-terminal aumenta a remoção do peptídeo através da barreira hematoencefálica via receptor RAGE, o que não ocorre se for direcionado à região C-terminal (BACHMEIER et al., 2011; DEANE et al., 2009).

Alguns estudos demonstram a presença de outros Acs no soro e líquor. Anticorpos contra ATP-sintase são encontrados no soro de pacientes com DA e podem aumentar a captação de HDL-colesterol aumentando o risco de desenvolvimento de demência (VACIRCA et al., 2011). Outros autores relatam também a presença no soro de Acs antirreceptores do glutamato (DAVYDOVA et al., 2009) e, no líquor, de anti-SR proteína Kinase 1, enzima envolvida na proliferação celular (DANIILIDOU et al., 2011).

#### **1.4.4 - Diagnóstico da DA e biomarcadores**

O diagnóstico da DA é eminentemente clínico e baseado em critérios diagnósticos definidos por consenso de especialistas. Os principais critérios diagnósticos são aqueles apresentados pelo *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke/Alzheimer's Disease and Related Disorders Association - NINCDS-ADRDA* (MCKHANN et al., 1984), DSM-IV/TR (APA, 2002) e do CID-10 (OMS, 1993). Existem significativas diferenças entre esses critérios quanto à definição de demência. As principais diferenças entre eles são quanto à exigência ou não da presença de alterações tanto da memória de curta quanto de longa

duração e alterações do pensamento abstrato, julgamento e resolução de problemas (ERKINJUNTTI et al., 1997).

A Academia Brasileira de Neurologia recomenda o uso no Brasil dos critérios do DSM-IV/TR para demência e do NINCDS-ADRDA para definição da DA (NITRINI et al., 2005a). Apresenta também recomendações quanto à investigação diagnóstica por imagem, laboratorial e testes de avaliação cognitiva (NITRINI et al., 2005b).

Os critérios do DSM-IV para demência do tipo Alzheimer exigem a presença de déficits cognitivos múltiplos com comprometimento da memória e pelo menos uma outra função cognitiva (afasia, apraxia, agnosia ou prejuízo do funcionamento executivo), que represente um comprometimento do funcionamento social e ocupacional. Segundo esses critérios o curso é marcado por início gradual e declínio contínuo das funções cognitivas. Além disso, devem ser excluídas todas as condições clínicas que sejam causa de demência, inclusive outro transtorno mental (APA, 2002).

Para o NINCDS-ADRDA, o diagnóstico clínico da DA pode ser "possível" ou "provável" e a confirmação ocorre apenas com o exame do tecido cerebral após a morte do paciente. O diagnóstico de DA provável exige a documentação de demência por meio de exame objetivo (Mini Exame do Estado Mental ou similar), confirmado por exame neuropsicológico. Os déficits cognitivos devem ser progressivos com início entre os 40 e 90 anos de idade e ausência de doença que pudesse ser responsável pela demência. Também deve haver comprometimento das atividades de vida diária (MCKHANN et al., 1984).

As dificuldades diagnósticas, principalmente quanto à diferenciação entre transtorno cognitivo leve (aquele em que apenas uma função cognitiva está afetada, sem prejuízo sob o comportamento) e demência, levaram a revisão dos critérios do NINCDS-ADRDA. Uma das principais questões é a de como valorizar marcadores no diagnóstico (ALBERT et al., 2011; MCKHANN et al., 2011).

Muitos marcadores tem sido investigados para auxiliar o diagnóstico e acompanhamento dos pacientes com DA (GUSTAW-ROTHENBERG et al., 2010). Entre estes marcadores estão a quantificação no soro e plasma de A $\beta$  (MEHTA et al., 2000; MAYEUX et al., 2003),  $\alpha$  e  $\beta$  sPPA (OLSSON et al., 2003) proteína TAU, homocisteína, volume do hipocampo em exames de RNM, taxa de utilização cerebral de glicose em PET, depósitos de A $\beta$  no cérebro (HAMPEL et

al., 2008). Entretanto nenhum desses marcadores conseguiu sensibilidade e especificidade suficientes para serem amplamente utilizados na prática clínica (MCKHANN et al., 2011).

### 1.5 - *Phage Display*

A metodologia de *Phage Display* (PhD) consiste na expressão de polipeptídeos na superfície de bacteriófagos filamentosos para que possam interagir e se ligar a alvos de interesse como Acs e outras moléculas (SMITH, 1991). Os bacteriófagos, como o M13, tem capsídeos proteicos que envolvem seu material genético. Nas proteínas do capsídeo é possível expressar peptídeos e Acs formando bibliotecas utilizadas no processo de seleção (HOOGENBOON et al., 1998; PANDE et al., 2010; RADER; BARBAS, 1997). Os bacteriófagos M13 infectam bactérias *E. coli* sem provocar lise celular mas induzindo a formação e secreção de novas partículas virais (BARBAS et al., 2001). Na seleção (*biopanning*) os bacteriófagos de uma biblioteca são expostos ao alvo para se ligarem e serem recuperados enquanto que os não ligantes são lavados (Figura 1).

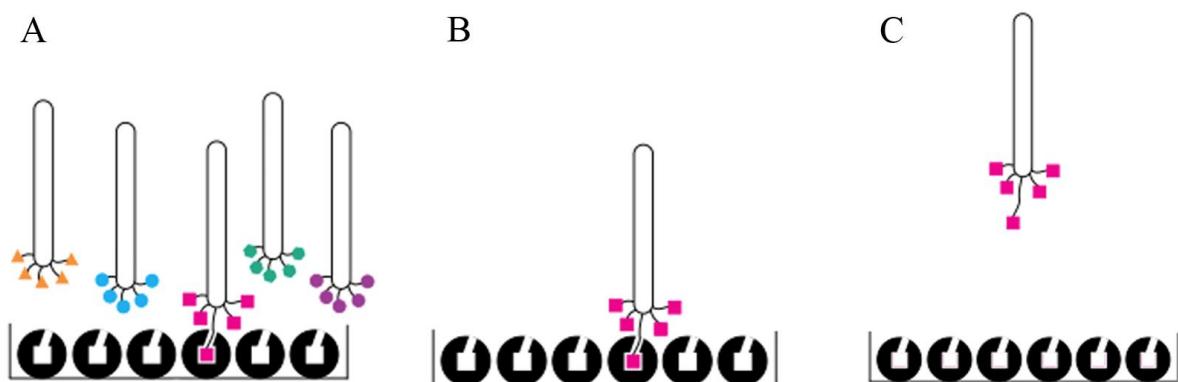


Figura 1 - Processo de *Biopanning*. Adiciona-se a biblioteca de bacteriófagos ao alvo imobilizado (A); os fagos que não se ligaram ao alvo são retirados por meio de sucessivas lavagens até que reste apenas os bacteriófagos que se ligaram (B); os bacteriófagos específicos são recuperados (C). Figura adaptada de: *PhD™ Phage Display Libraries: Instruction Manual*. New England BioLabs.

A técnica de PhD tem tido diversas aplicações em biotecnologia permitindo identificar ligantes para várias moléculas, peptídeos moduladores com atividade agonista ou antagonista de

receptores e peptídeos que possam ser utilizados em aplicações nanotecnologicas de diagnóstico (KRIPLANI; KAY, 2005; MOLEK;STRUKELJ;BRATKOVIC, 2011). Uma das aplicações é o mapeamento dos epítopos que são reconhecidos pelos Acs (LANE; STEPHEN, 1993). O PhD permite identificar regiões críticas de interação entre antígenos (Ags) e Acs por meio de peptídeos que mimetizam os Ag funcional ou conformacionalmente, os mimetopos (ROWLEY; O'CONNOR; WIJEYEWICKREUNAL, 2004). Os mimetopos podem ser selecionados a partir de imunoglobulinas purificadas ou soro (CORTESE et al.,1994) e caracterizados com ferramentas de bioinformática (HUANG et al, 2011).

## 2 - OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi selecionar peptídeos miméticos de Ag ligantes de imunoglobulinas (IgG) presentes no soro de pacientes com DA, utilizando a metodologia do *Phage Display*. Além disso procurou-se obter uma lista dos prováveis mimetopos desses Ags, por meio de ferramentas de bioinformática, na busca de novas informações sobre a atuação do sistema imune na DA.

### **3 - MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 - Seleção de pacientes, coleta e processamento inicial das amostras**

Foram convidados a participar desta pesquisa pacientes com diagnóstico de provável ou possível demência do tipo Alzheimer atendidos no Ambulatório de Demências do Serviço de Psiquiatria e Psicologia Médica do Hospital de Clínicas de Uberlândia (SPPM). Foram colhidas amostras dos pacientes que concordaram participar e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) conforme registro no Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (nº 304/09). No caso de pacientes indivíduos com significativo comprometimento cognitivo foram colhidas amostras apenas daqueles cujos familiares autorizaram a participação e assinaram o TCLE (Anexo 1).

Foram adotados como critérios de inclusão o diagnóstico de demência de acordo com a definição do DSM-IV TR (APA,2000), e de provável ou possível Doença de Alzheimer pelo critério NINCDS-ADRDA (MCKHANN,1984). Os pacientes foram estadiados quanto ao quadro clínico utilizando a CDR, versão em português (MONTAÑO,2005). Os critérios de exclusão foram: não consentimento ou desistência em participar do estudo a qualquer momento; diagnóstico de outra doença clínica que seja causa de demência; evidência de significativo comprometimento cerebrovascular nos exames de imagem que indicasse diagnóstico de demência mista e avaliação diagnóstica incompleta.

Os testes neuropsicológicos utilizados para auxiliar o diagnóstico foram: Mini exame do estado mental, CANCOG/CANDEX-R, escala de memória de Wechsler (WMS-R), Teste de nomeação de Boston, Fluência verbal semântica e fonológica, Teste do relógio, Teste dos Cinco Pontos e dos Sinos, Lista de Palavras e Figuras, Teste de Stroop, Teste de trilhas, Palavras e Figura de Rey.

Para o grupo controle foram selecionados pacientes que não apresentavam evidência de déficit cognitivo pelo teste de rastreio Mini Exame do Estado Mental, conforme os critérios diagnósticos.

As amostras de sangue foram colhidas utilizando tubos *Vacutainer* contendo K2EDTA. As amostras foram centrifugadas e o soro estocado a -20°C até a realização dos experimentos.

### 3.2 - Seleção de peptídeos miméticos a auto-antígenos de Alzheimer (*Biopanning*)

A seleção de bacteriófagos foi realizada a partir de um *pool* de soro dos pacientes controles e com DA. As imunoglobulinas G (IgGs) foram capturadas em microesferas magnéticas acopladas a proteína G (*Dynabeads - Invitrogen*). As microesferas (100  $\mu$ L) foram lavadas em 500  $\mu$ L de solução tampão MES (0,1M, pH 5,0) para ativação da proteína G. A seleção foi realizada em duas etapas, uma de subtração dos bacteriófagos expressando peptídeos inespecíficos e outra de captura daqueles expressando peptídeos ligantes dos Acs dos pacientes com DA (Figura 2).

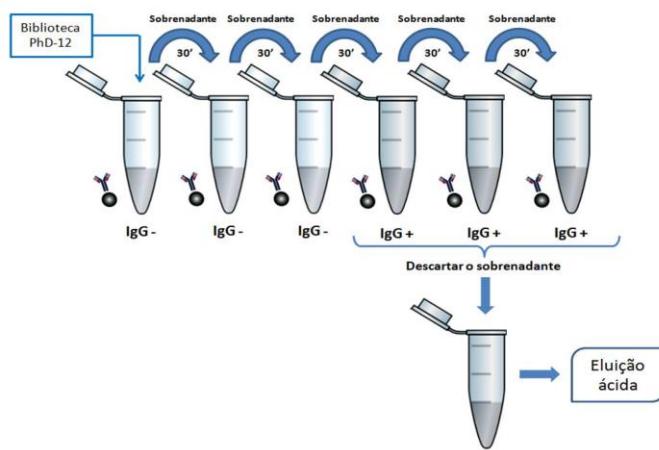


Figura 2 - Ciclo de seleção dos peptídeos miméticos mostrando as três etapas de subtração de ligantes inespecíficos e as três etapas de seleção positiva (Fonte: do autor).

Para a subtração de bacteriófagos expressando peptídeos inespecíficos incubou-se 10  $\mu$ L ( $1 \times 10^{11}$  partículas virais) da biblioteca de fagos M13 (PhD-12 - *New England Biolabs Inc.*) em 190  $\mu$ L de TBS-Tween 0,1% com IgG de controles saudáveis. Após 30 minutos foi feita a separação magnética. O eluato de fagos passou por subtração por mais 2 vezes e depois foi utilizado na seleção positiva.

A seleção positiva foi feita com as esferas ligadas a IgGs de pacientes com DA. Os bacteriófagos do eluato permaneceram em solução com as microesferas por 30 minutos, em três etapas sucessivas de seleção, para se ligarem às IgGs. Ao final os fagos foram recuperados das microesferas por eluição ácida (500  $\mu$ L de Glicina, pH=2, por 10 min, neutralizada com 75  $\mu$ L de Tris, pH=9).

### **3.3 - Amplificação e purificação de bacteriófagos mimetopos**

Os bacteriófagos (500  $\mu$ L) foram amplificados em *E. coli*, linhagem ER2738, em meio *Luria Bertani* (Triptona 10g/L, extrato de levedura 5g/L, NaCl 10g/L), com tetraciclina (20mg/mL) na fase *early-log* ( $DO_{600} \sim 0,3$ ) por 4 a 5 horas, a 37°C, sob agitação. A cultura foi então centrifugada (10.000rpm, 4°C, por 10 min). Ao sobrenadante foi adicionado PEG/NaCl (20% de polietileno glicol 8000 e 2,5 M de NaCl – solução estéril; volume de 1:6 do sobrenadante). Esta solução foi incubada por 12 horas a 4°C. Após esse período a solução foi centrifugada para separação dos fagos (10.000 rpm, 15min). Adicionamos 1 ml de TBS e PEG/NaCl (volume de 1:6). Após 1 hora de incubação a 4°C, centrifugou-se a amostra para precipitação dos bacteriófagos (14.000rpm, 10min, 4°C).

No final foram adicionados 200 $\mu$ L de TBS a 0.02% de  $NaN_3$ , obtendo-se então, eluato amplificado de bacteriófagos, posteriormente titulado para determinar a quantidade de partículas virais e armazenado a 4°C para duas novas etapas de *biopanning* conforme já descrito.

### **3.4 - Titulação**

Para todas as titulações foram utilizados 1,0  $\mu$ L de bacteriófagos em 9,0  $\mu$ L de meio de cultura LB conforme já descrito. As diluições  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$  foram feitas para eluatos não amplificado e de  $10^{-8}$  a  $10^{-11}$ , para fagos amplificados. As diluições foram incubadas com 200  $\mu$ L de *E. coli* (ER2738) em fase *mid-log* ( $DO_{600} \sim 0,5$ ) por 5 minutos e plaqueadas em meio LB contendo IPTG (0,5 mM) e X-gal (40  $\mu$ g/mL), juntamente com 3,0mL de Agarose Top (10g de Bacto-Triptona, 5g de extrato de levedura, 5g de NaCl, 1g de  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  / litro).

Depois da incubação por 18 horas a 37°C, as colônias que apresentaram coloração azul, devido hidrólise do X-Gal pela enzima  $\beta$ -galactosidase presente no fago, foram contadas para determinar os títulos de fagos.

### **3.5 - Extração e sequenciamento do DNA**

As colônias isoladas das placas no final do terceiro ciclo de *biopanning* foram transferidas para placas de cultura com 1,2 mL de cultura de *E. coli* ER2738 em fase *early-log*

(DO600 ~0,3) e incubadas a 37°C sob agitação (250 rpm por 24 horas) e depois centrifugadas (3700 rpm a 20°C por 30 minutos).

O sobrenadante com os bacteriófagos (800µL) foi transferido para outra placa e incubados por 10 minutos com 350µL de PEG/NaCl. Foi feita centrifugação (3700rpm a 20°C por 40 min) para precipitar dos fagos. Aos fagos adicionou-se 100µL de tampão iodeto (10mM de Tris-HCl pH 8, 1mM de EDTA e 4M de NaI). Agitou-se por 40 segundos e adicionou-se etanol absoluto (250 µL) para incubação (10min a temperatura ambiente). Centrifugou-se novamente (3700 rpm, a 20 °C por 10min.) descartando-se o sobrenadante. O DNA extraído foi lavado com etanol 70% (500 µL) e centrifugado nas mesmas condições anteriores. O DNA foi diluído em água Milli-Q (20 µL). A verificação da qualidade do material extraído foi feita por eletroforese em gel de agarose (0,8%) corado com brometo de etídeo.

A reação de sequenciamento do DNA foi realizada em 35 ciclos com as seguintes condições: desnaturação a 95°C por 20 s; anelamento a 50°C por 15 s; extensão a 60°C por 60s. Utilizou-se o termociclador *Master Cycler-Eppendorf*, 200 ng de DNA molde, 5pmol do primer 96gIII da *Biolabs* e premix *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit, Amersham Biosciences*. O DNA sequenciado precipitado em 1µL de acetato de amônio e 27,5 µL etanol foi centrifugado (3700 rpm, 45 min). Após descarte do sobrenadante adicionou-se etanol 70% (150 µL) e o DNA foi recentrifugado na mesma velocidade por 15 min e o sobrenadante descartado. O precipitado em solução com tampão de diluição (10 µL, *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit – Amersham Biosciences*) foi lido em sequenciador automático (*MegaBace1000 - Amersham Biosciences*). A análise das sequências ocorreu no *software* do sequenciador (*Sequence Analyser, Base Caller, Cimarron 3.12, Phred 15*).

### **3.6 - Bead-ELISA (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay in Bead*)**

Os clones foram utilizados em *bead-ELISA* contra os *pools* de IgGs dos controles e pacientes com DA para avaliar a reatividade e a especificidade da seleção. Em uma placa de microtitulação de 96 poços, não carregada, foi depositado em triplicata 1 uL de microesferas acopladas com as imunoglobulinas G. Em seguida foram acrescentados 50 uL de sobrenadante de cultura dos fagos, os quais foram incubados com as microesferas por 1 hora, sob agitação a temperatura ambiente. Com o auxílio de um aparato magnético as microesferas foram

precipitadas, lavadas 6 vezes com TBS-T 0,1% e incubadas com o anticorpo monoclonal anti-M13 conjugado com peroxidase (*GE Healthcare*) na diluição de 1:5000 em tampão TBST 0,1% BSA 5% por 1 hora, sob agitação a temperatura ambiente. As microesferas foram novamente precipitadas, lavadas 6 vezes e a reação foi revelada com o tampão orto-fenilenodiamina (OPD) a 1 mg/ml acrescido de 3% de água oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

### **3.7 - Análise de Bioinformática**

As sequências de DNA foram submetidas a análises *in silico*. As sequências do vetor foram retiradas e a dedução da sequencia dos peptídeos foram feitas utilizando o *ExPASy Translate Tool* (<http://web.expasy.org/translate>).

As sequências dos peptídeos foram alinhadas na ferramenta *ClustalW2* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>) e *Kalign* (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/kalign>) para busca de consenso. Para caracterização dos peptídeos mais reativos no ELISA, eles foram comparados a proteínas conhecidas do banco de dados *SwissProt* utilizando a ferramenta on-line de alinhamento *BLAST* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), com o algoritmo *blastp*, limitando a procura a sequências de *Homo sapiens*. Foram selecionados os alinhamentos com identidade de 100% . As proteínas identificadas foram então avaliadas quanto a sua origem, sendo selecionadas aquelas originadas do tecido neural, e quanto a sua relação com a DA de acordo com a literatura.

A estrutura tridimensional das proteínas foi pesquisada no banco de dados *PDB* (<http://www.rcsb.org>). A ferramenta *PepSurf* foi utilizada para identificação de epítopos e regiões de alinhamento na estrutura tridimensional utilizando o arquivo *PDB*. Para as proteínas sem estrutura disponível foi avaliada a previsão de epítopos lineares utilizando a ferramenta *Bepipred 1.0* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>) a partir da sequência *FASTA* disponível no *BLAST*.

### **3.8 - Análise Estatística**

A análise estatística das variáveis idade, tempo de escolaridade e reatividade dos bacteriófagos ao *pool* de soro foi realizada no programa *GraphPad Prism* para *Windows*, versão 5.00 (*GraphPad Software Inc.*). Foram realizados os teste de D'Agostino e Person para verificar a normalidade dos dados, Teste T para comparação entre médias e Mann-Whitney para comparação de medianas.

## 4 - RESULTADOS

Neste estudo foram avaliados 100 pacientes com queixa de transtornos cognitivos em acompanhamento no ambulatório de Demências do SPPM. Foram convidados a participar da pesquisa 10 pacientes com diagnóstico de DA que apresentavam investigação diagnóstica completa com exames laboratoriais, de imagem e avaliação das funções cognitivas por testes neuropsicológicos, e 10 pacientes cognitivamente saudáveis como controles. As variáveis idade e escolaridade tiveram distribuição normal no teste de D'Agostino Person. Não houve diferença significante entre as idades nos dois grupos ( $70,2 \pm 8,2$  anos para pacientes com DA e  $69,3 \pm 7,6$  anos para controles,  $P=0,803$ ); 60% eram do sexo feminino e 40% masculino igualmente distribuídos nos grupos. A escolaridade média dos controles foi maior que no grupo de pacientes, com diferença estatística no teste t ( $3,5 \pm 2,3$  anos no grupo DA e  $8,9 \pm 5,25$  anos para controles,  $P<0,05$ ). O tempo médio de evolução da doença foi de  $4,2 \pm 1,9$  anos. (Tabela 1).

Tabela1 - Descrição dos grupos experimentais quanto a idade, sexo, escolaridade. Para o grupo DA é apresentado o tempo de evolução da doença.

	DA	Controles
Idade <sup>1</sup>	$70,2 \pm 8,2$ anos	$69,3 \pm 7,6$ anos
Sexo	60% feminino	60% feminino
Escolaridade <sup>2</sup>	$3,5 \pm 2,3$ anos	$8,9 \pm 5,25$ anos
Tempo de evolução da doença	$4,2 \pm 1,9$ anos	-

1 -  $P<0,803$ ; 2 -  $P<0,05$

Os dados da avaliação neuropsicológica não são apresentados e nenhuma correlação entre eles e os resultados encontrados pode ser feita por que os testes foram realizados na avaliação inicial dos pacientes no ambulatório e não na época da entrada do paciente no protocolo de pesquisa. Eles não refletem o quadro clínico dos pacientes no período da coleta das amostras.

Após a seleção e sequenciamento do DNA dos clones, foram encontradas 75 sequências completas sendo que 71 foram distintas (Tabela 3).

Tabela 23 - Sequências encontradas a partir dos clones selecionados no Biopanning e sua frequência.

Clones	Sequência	Frequência
A01/G03	TRSLRRRINHTN	2/75
A04	RRSSKHRRSTRN	1/75
A05	IRITHKHIKINL	1/75
A07	LKNGLLGVRKRN	1/75
A10	KIRRHSPPSSRF	1/75
A11	SPRPMMRRIRKQ	1/75
A12	SPKMNLNPRRN	1/75
B02	RIRMLHRINLPH	1/75
B04	IRRKITPKMMRS	1/75
B06	LIKRRMLINSTQ	1/75
B08/F07	HMIRSRRINIPH	2/75
B09	IQQRRRIQRRIT	1/75
B10	NIHIRIRLNKPQ	1/75
B11	HIPIQMIKRQLI	1/75
B12	LNLRRKRINRPH	1/75
C01	MRRQRRLRLRLR	1/75
C03	IHRSLHTNNRIR	1/75
C05	TSISINPPRRPS	1/75
C07	IIPNQRMPPMIH	1/75
C09	RKLRLQTRIHRP	1/75
C10	LKIIRMIINLTH	1/75
C11	PNRRHRRSPRNI	1/75
C12	HRRKLRLTNLTL	1/75
D01	KIQPSRIINITN	1/75
D02	IPMRKRNRRMHL	1/75
D03/D04/H01	SRPRPLIRNRRP	3/75
D05/E06	QLPNRSLINLPH	2/75
D07	KRNMRRRPLHRS	1/75
D08	QRKRMILINLPH	1/75
D09	IMSPRRSILRSR	1/75

D11	MTIRRHRHRPKI	1/75
D12	IRKILQIRIHLM	1/75
E02	RIMISPIINRPH	1/75
E03	SSRITRLINRPH	1/75
E04	TQRRPSINMRHR	1/75
E05	SRRRIPRINRPQ	1/75
E07	RRRIKRQRRIIT	1/75
E08	IKRIRRKRTTRRL	1/75
E11	KRRNTILINLPN	1/75
E12	SPMRSMMLRRRLI	1/75
F01	NIRIIKNMRLR	1/75
F02	RKLPTLNLKPQ	1/75
F03	PRKIIRIRLRHK	1/75
F04	IITMSMIKRRSI	1/75
F05	TLHNIRIQLMRP	1/75
F06	PIRLRSRINLTN	1/75
F08	IKRIRRKRTTRRL	1/75
F10	TPIKKMIRRLPH	1/75
F11	NHIRNKLRSIMI	1/75
F12	LRLKLTPRRRRT	1/75
G01	KHNRPRRSMRRS	1/75
G02	HPMSSQRINRTN	1/75
G03	TRSLRRRINHTN	1/75
G04	TQRTISIINQTN	1/75
G05	IIPSIIKIKKI	1/75
G06	SSSRIRKINLTN	1/75
G07	RNLSPRRSIRRP	1/75
G08	HLRRSQRRRIRI	1/75
G09	LPTKRIIKRMRR	1/75
G11	MSLNLRMRPMRI	1/75
G12	RIRMLHRINLPH	1/75
H02	RKTTLNMINIPH	1/75
H03	ITIQMIRITRRS	1/75
H04	IRRNIKRKLRL	1/75

H05	MSNKRQLIRIQP	1/75
H06	PRPKRIIINLPH	1/75
H08	IKTLPRLIRRLR	1/75
H09	KMTRRTHINQIS	1/75
H10	NKPPRRPSRLNR	1/75
H11	RSIPRIHINTTN	1/75
H12	SINPIQIISTKI	1/75

O alinhamento no *ClustalW2* e *Kalign* permitiu identificar 3 consensos frequentes. A sequência INxPH ocorre completa ou parcialmente em 15 peptídeos, antecedida por um aminoácido apolar. A posição x é ocupada por leucina ou arginina. Outra comum é RRI, antecedida de um aminoácido do grupo dos polares básicos. Ela que ocorre em 16 dos peptídeos selecionados. Já o sequência xPRRS, onde x é frequentemente serina, arginina ou prolina, ocorre em 9 aminoácidos e é seguida de um aminoácido apolar.

O ELISA realizado com os 71 clones para o *pool* de IgG dos pacientes e controles mostrou diferença significante entre os dois grupos no teste de Mann Whitney ( $U=3018$ ,  $P<0.0001$ ) (Figura 3).

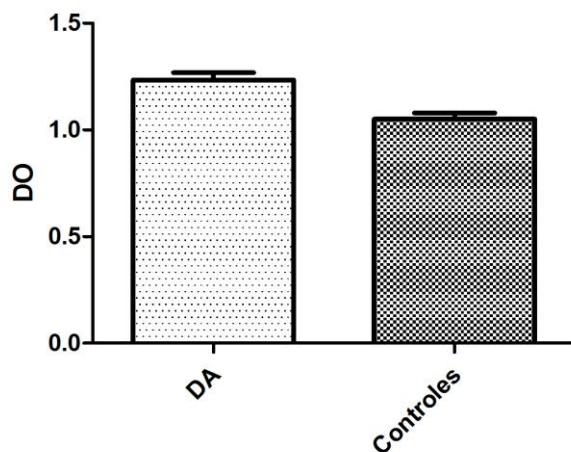


Figura 3 - Comparaçao entre a reatividade (DO) dos clones frente ao *pool* de soro dos pacientes e controles. ( $P<0,001$ ).

Após análise do ELISA foram selecionados 10 clones que apresentaram Índice ELISA maior que 1 para melhor caracterização por bioinformática (Figura 4).

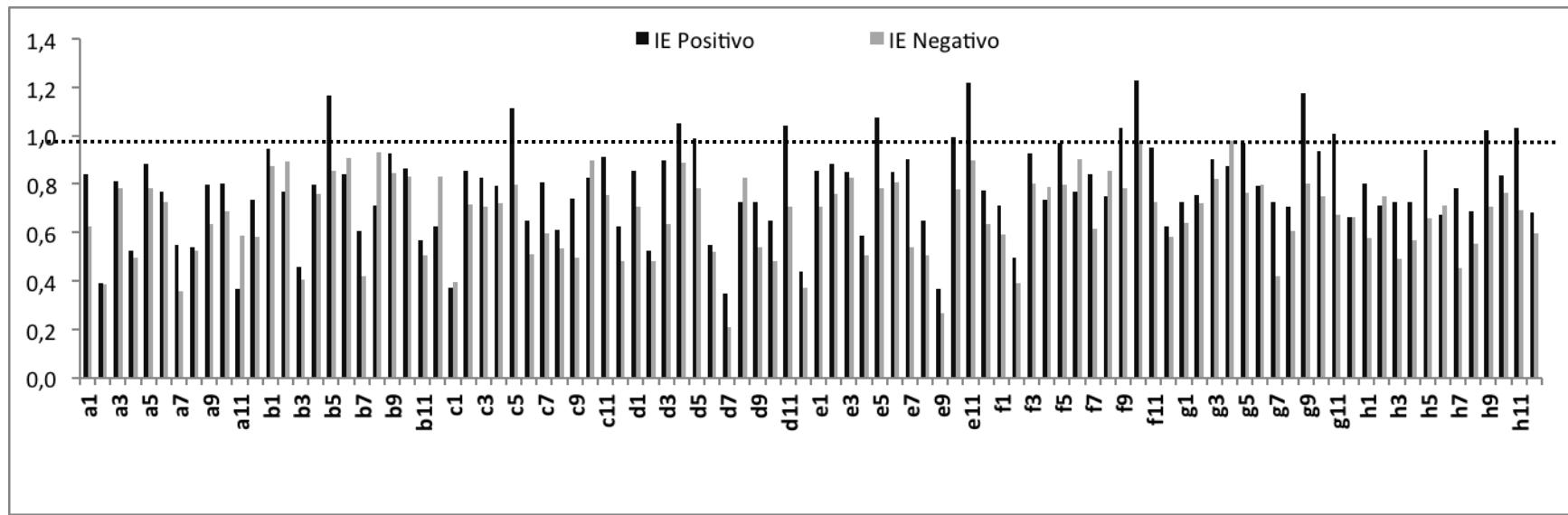


Figura 4 - Painel de pré-validação, mostrando a reatividade dos clones reconhecidos por IgG purificadas de pacientes com DA (Índice Elisa) e controle. Índice ELISA (IE) = densidades óticas (DO)/*cut off*, onde o *cut off* = média dos negativos + 2x desvio padrão dos negativos. Foram selecionados os clones com IE maior que 1.

Os peptídeos selecionados neste trabalho mostram similaridade com proteínas presentes no sistema nervoso central ou exclusivas dele, envolvidas no neurodesenvolvimento ou plasticidade sináptica. Também foram encontradas similaridades com proteínas de relação conhecida com a DA e outras doenças neurodegenerativas (Tabela 4).

Tabela 4 - Resultado do alinhamento pelo BLAST das sequências dos peptídeos recombinantes com as das proteínas depositadas no banco SwissProt.

Clone	Proteínas
C05	Neurexina 3 $\beta$
	PLK4
D04	Neuroserpina
	Gene 2 de suscetibilidade ao Autismo
D11	DNAJ homologa, subfamília C, membro 18
	DNAJ homologa, subfamília C, membro 14
E05	Proteína PRUNE 2
	DNAJ homologa, subfamília A, membro 3
	MINT1/X11
E11	Fator 6 associado ao receptor de TNF
	Receptor $\alpha$ 3 do GDNF
	DNAJ homologa, subfamília C, membro 1
F10	Trombospondina tipo 1
	Subunidades $\alpha$ 2, $\alpha$ 3, $\alpha$ 4 e $\alpha$ 6 do receptor nicotínico de acetilcolina
G09	Enzima conversora da angiotensina
G11	Neurabina 1
H09	DNAJ homologa, subfamília C, membro 16
H11	CD44

Foram realizados alinhamentos tridimensionais utilizando *Pepsurf* para as proteínas encontradas no banco PDB e suas estruturas. Os resultados mostraram alinhamentos dos peptídeo com as proteínas mapeando os prováveis autoepítópos (Figura 5).

Na figura 5A é mostrada a estrutura tridimensional da PLK4 e na figura 5B o alinhamento com a sequência do clone C05. O PDB não possui a estrutura da Neurexina 3 $\beta$ .

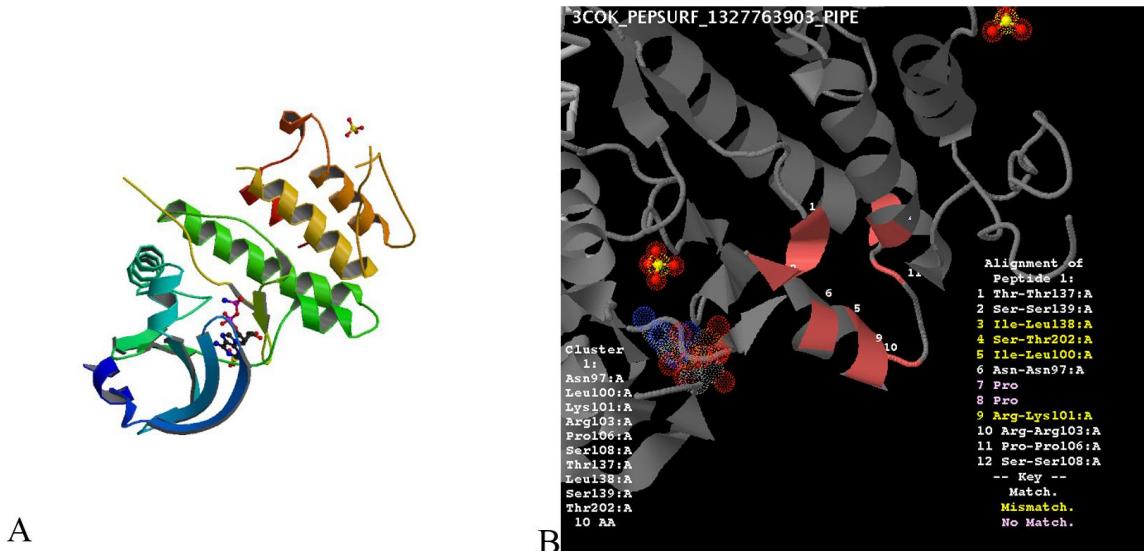


Figura 5 - Alinhamento tridimensional da PLK4. A imagem da estrutura da proteína é apresentada em A (fonte: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) e o alinhamento em B (fonte: <http://pepitope.tau.ac.il/>). A região de alinhamento com o peptídeo recombinante é marcada em rosa.

A estrutura da neuroserpina é mostrada na figura 6A e o alinhamento dos resíduos de aminoácidos do clone D04 na figura 6B. Uma região do peptídeo expresso nesse clone também é semelhante à proteína do Gene 2 de Susceptibilidade ao Autismo e é região prevista pelo *Bepipred* como epítopo linear.

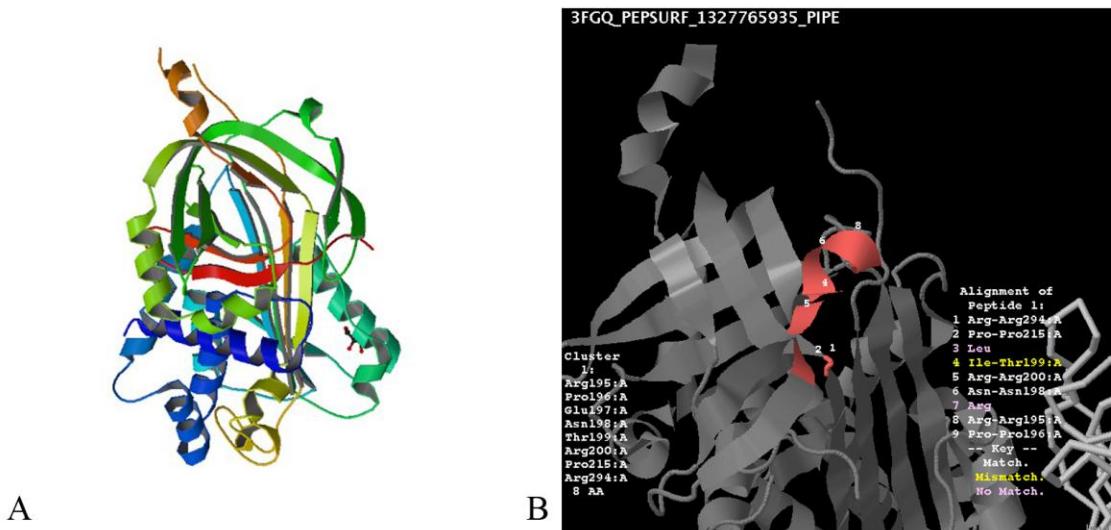


Figura 6 - Alinhamento tridimensional do clone D04 com a Neuroserpina: em A, a estrutura da proteína (fonte: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) e em B (fonte: <http://pepitope.tau.ac.il/>) a região de alinhamento. A região de alinhamento com o peptídeo recombinante é marcada em rosa.

O peptídeo do clone D11 tem similaridade com duas proteínas da subfamília C da DNAJ: membros 14 e 18. Apesar de não serem encontradas no banco PDB, as regiões de alinhamento com o clone são previstas como epítópos pelo *Bepipred*.

O clone E05 apresentando um mimetopo presente no membro 3 da subfamília A da proteína DNAJ homologa, tem seu alinhamento mostrado na figura 7B ao lado da estrutura da proteína (figura 7A). Outra proteína de interesse que se alinhou com o peptídeo é a MINT1/X11 apresentada na figura 8 ao lado do resultado da pesquisa no *PepSurf*. Esse clone também tem similaridade com os resíduos entre as posições 2223 e 2228 da proteína homóloga PRUNE2 mas está não é região prevista pelo *Bepipred* como epítopo.

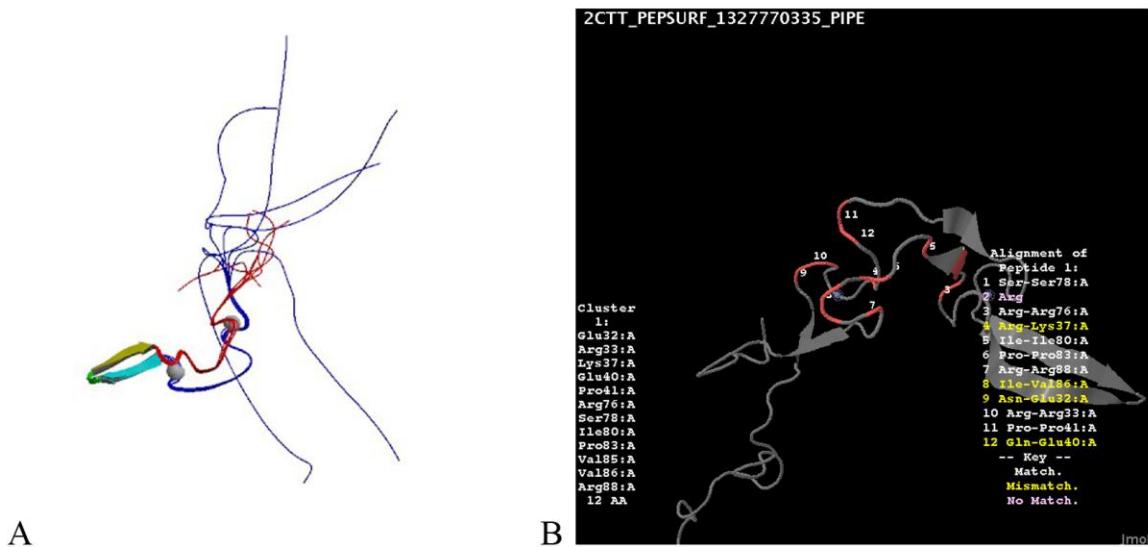


Figura 7 - Alinhamento tridimensional da proteína DNAJ, membro 3 da subfamília A: em A, a imagem da estrutura (fonte: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) e em B a região de alinhamento ((fonte: <http://pepitope.tau.ac.il/>)). A região de alinhamento com o peptídeo recombinante é marcada em rosa.

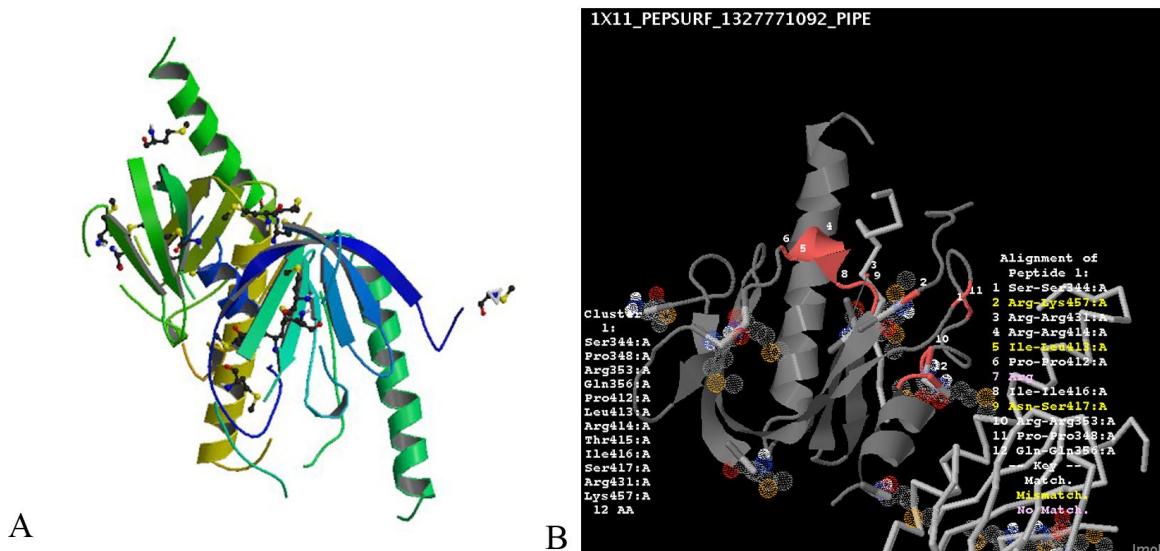


Figura 8 - Alinhamento tridimensional da proteína MINT1/X11: em A, a imagem da estrutura (fonte: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) e em B a região de alinhamento ((fonte: <http://pepitope.tau.ac.il/>)). A região de alinhamento com o peptídeo recombinante é marcada em rosa.

A região compreendida entre os resíduos 219 e 229 do fator 6 associado ao receptor do TNF (figura 9A) e entre os resíduos 231 e 235 do receptor  $\alpha 3$  do GDNF (figura 10A) tem similaridade com o peptídeo do clone E11. O alinhamento tridimensional é apresentado nas figuras 9B e 10B respectivamente. Para esse mesmo peptídeo as análises em BLAST mostraram alinhamento com o membro 1 da subfamília C da DNAJ mas não é um epítopo linear previsto pelo *Bepipred*.

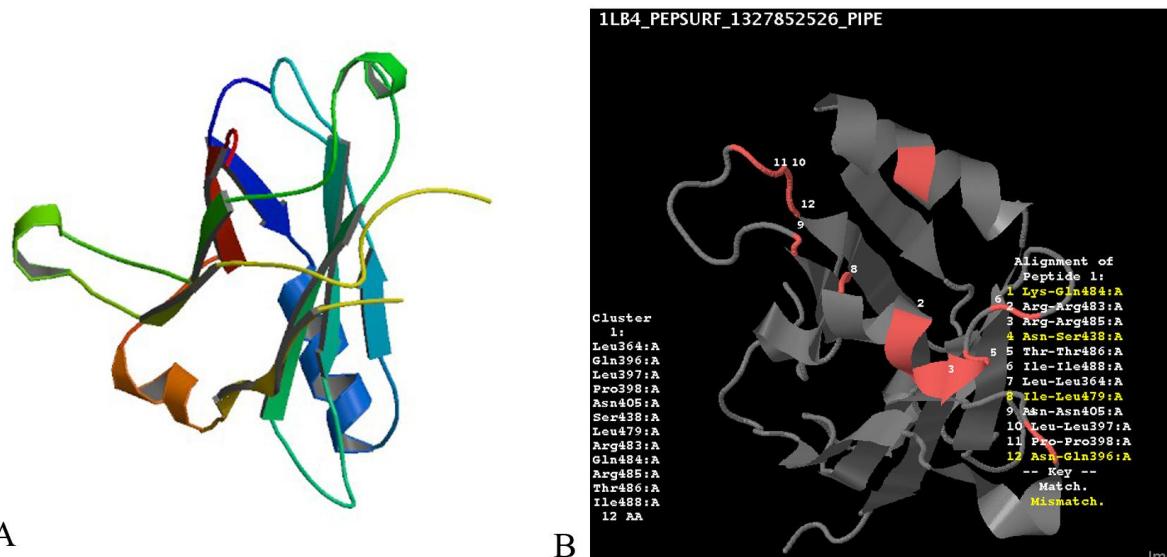


Figura 9 - Alinhamento tridimensional do fator 6 associado ao receptor do TNF. Em A, a imagem da estrutura (fonte: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) e em B a região de alinhamento ((fonte: <http://pepitope.tau.ac.il/>). A região de alinhamento com o peptídeo recombinante é marcada em rosa.

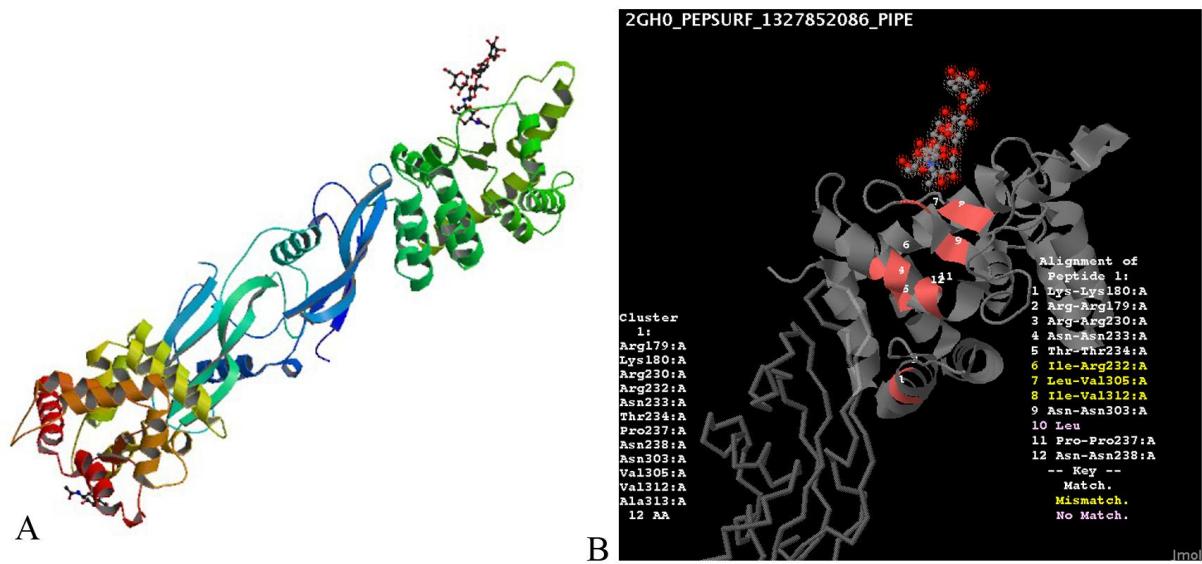


Figura 10 - Alinhamento tridimensional com receptor  $\alpha 3$  do GDNF. Em A, a imagem da estrutura (fonte: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) e em B a região de alinhamento ((fonte: <http://pepitope.tau.ac.il/>).

Para o clone F10 é apresentado alinhamento com a Trombospondina 1 (figura 11). Não estão disponíveis as estruturas tridimensionais das unidades do receptor nicotínico da acetilcolina e as regiões de interesse não são previstas como epítópos lineares.

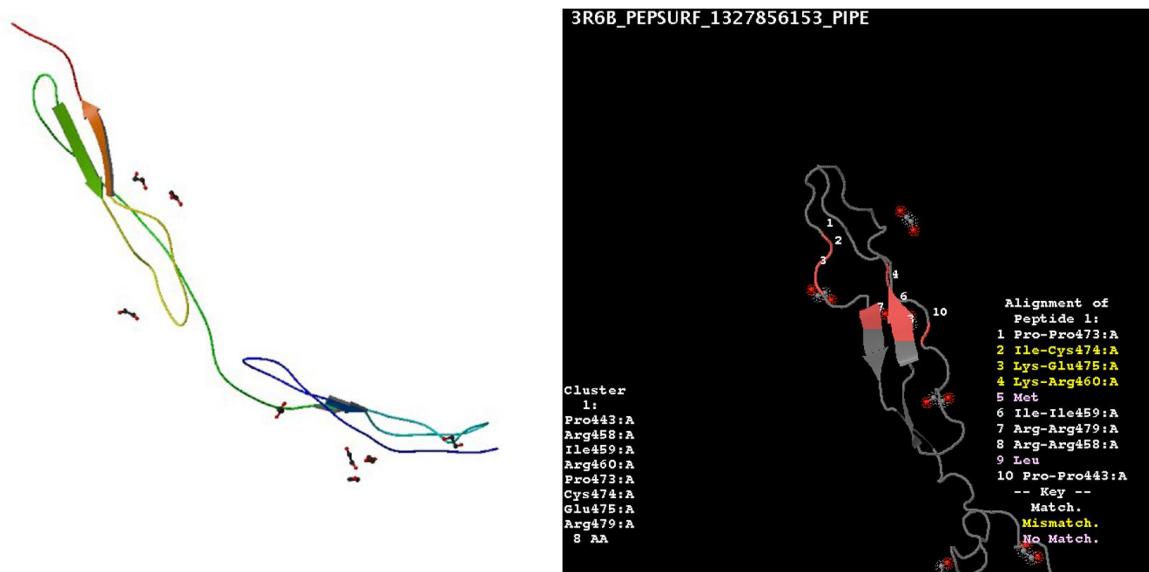


Figura 11 - Alinhamento tridimensional da Trombospondina 1. Em A, a imagem da estrutura (fonte: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) e em B a região de alinhamento (fonte: <http://pepitope.tau.ac.il/>). A região de alinhamento com o peptídeo recombinante é marcada em rosa.

A região KRIIK do peptídeo expresso no clone G09 é semelhante à região compreendida entre os resíduos 718 e 722 da Enzima conversora da Angiotensina (figura 12A). O resultado do alinhamento no *Pepsurf* é mostrado na figura 12B. Para o clone G11 as figuras 13A e B mostram a estrutura do da neurabina 1 e o resultado do *Pepsurf*.

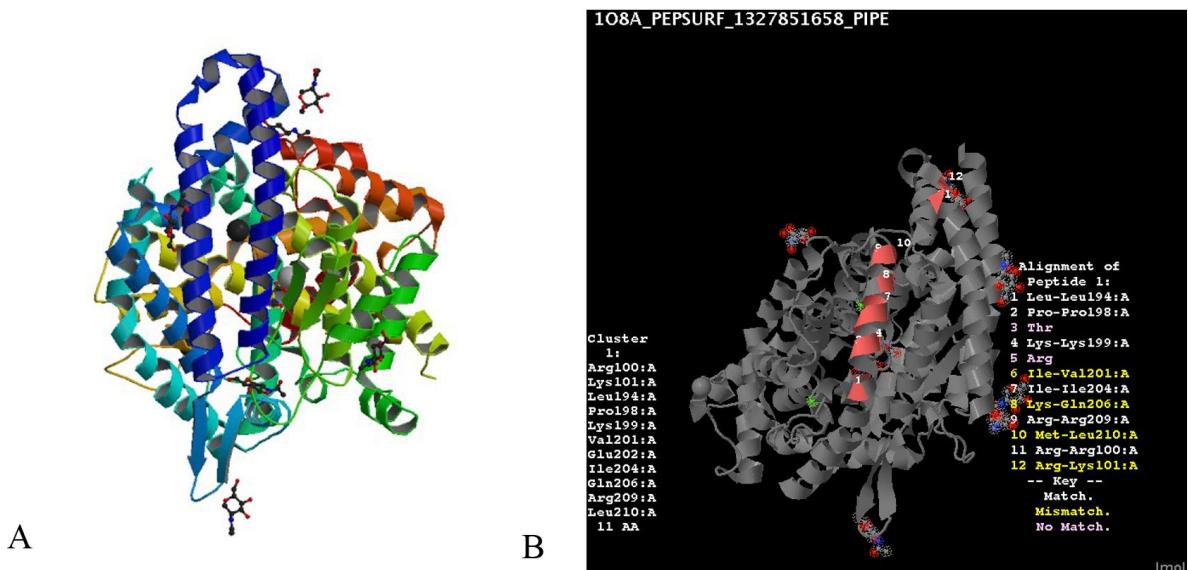


Figura 12 - Alinhamento tridimensional da Enzima Conversora da Angiotensina.. Em A, a imagem da estrutura (fonte: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) e em B a região de alinhamento ((fonte: <http://pepitope.tau.ac.il/>). A região de alinhamento com o peptídeo recombinante é marcada em rosa.

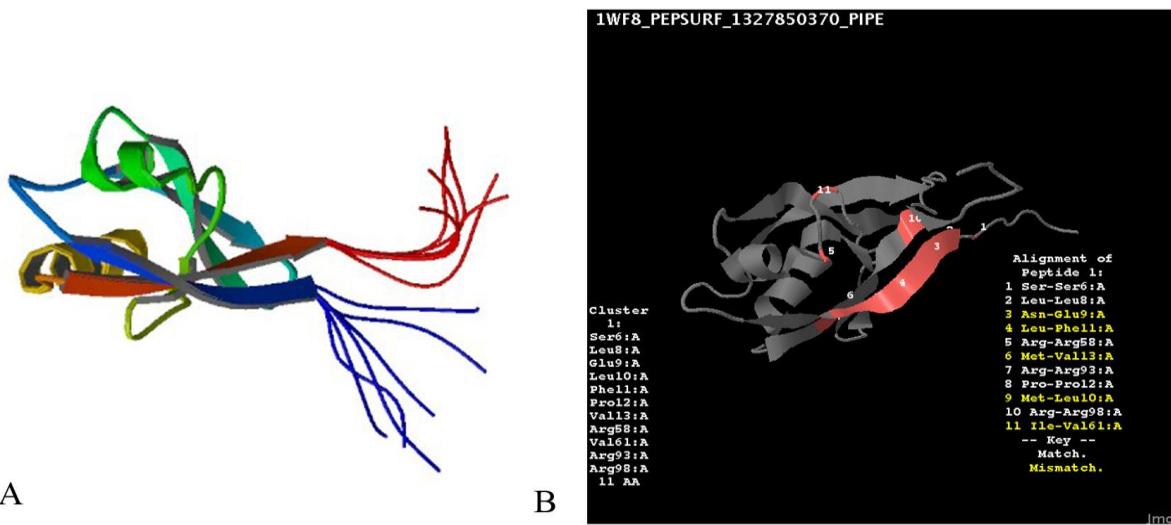


Figura 13 - Alinhamento tridimensional da Neurabina 1. Em A, a imagem da estrutura (fonte: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) e em B a região de alinhamento ((fonte: <http://pepitope.tau.ac.il/>)). A região de alinhamento com o peptídeo recombinante é marcada em rosa.

O BLAST mostrou similaridades entre o clone H09 e o membro 16 da subfamília C do DNAJ mas esta não foi encontrada no PDB e a região de similaridade não é prevista como epítopo linear. O peptídeo expresso no clone H11 se alinhou com a CD44 (figura 14).

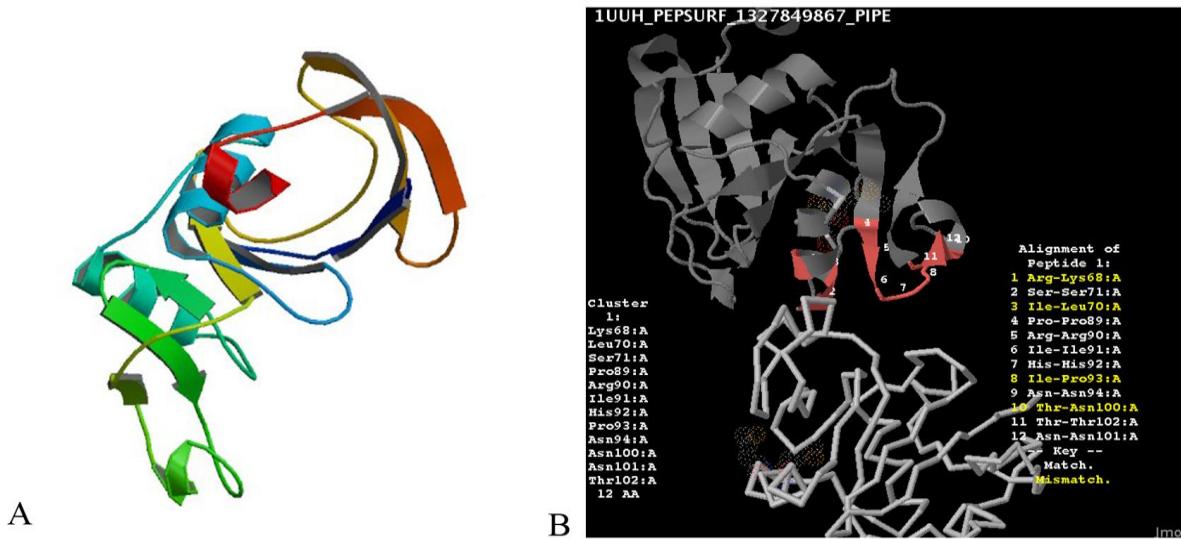


Figura 14 - Alinhamento tridimensional do CD44. Em A, a imagem da estrutura (fonte: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) e em B a região de alinhamento ((fonte: <http://pepitope.tau.ac.il/>)). A região de alinhamento com o peptídeo recombinante é marcada em rosa.

## 5 - DISCUSSÃO

Neste estudo utilizou-se a metodologia de PhD para obtenção de peptídeos ligantes de imunoglobulinas G específicos de pacientes com DA que pudessem ser utilizados em futuros testes diagnósticos e a identificação de mimetopos reconhecidos por esses Acs. A identificação dos mimetopos pode revelar novos alvos de estudo ou intervenção na patogênese da DA.

Como as bibliotecas utilizadas em PhD apresentam um variedade considerável de peptídeos chegando à ordem de bilhões de sequências aleatórias, a obtenção de sequências consensuais que indicam redução da variabilidade e a identificação nos alinhamentos com proteínas depositadas em bancos de dados específicas de tecidos neurais ou diretamente relacionadas à doença é um indicador de que o processo de seleção parece ter sido eficaz (RODI et al., 2002).

Outros estudos já avaliaram a participação de AAcs na DA mas limitaram-se a alvos específicos selecionados com base nas interações entre os diversos elementos já conhecidos ou a partir de modificações ocorridas na evolução da doença. Nesses estudos foram investigados Acs dirigidos a receptores de dopamina, produtos da peroxidação de lipídios, PPA, A $\beta$ , entre outros (COLASSANTI et al., 2010). Apenas um estudo, utilizando a abordagem de varredura de proteínas, procurou conhecer o tamanho da variedade de AAcs presente no soro desses pacientes (NAGELE et al., 2011). Outro estudo que preocupou-se com a caracterização dos Ags reconhecidos por esses Acs, mostra que, enquanto jovens formam imunoglobulinas para alvos de peso molecular maior que 105 kD e idosos saudáveis para alvos menores que 40 kD, os pacientes com DA tem Acs dirigidos para proteínas entre 40 e 100 kD (LEVIN et al., 2010). Nenhum estudo até o presente momento havia identificado os epítópos prováveis desses Acs e nem utilizado a metodologia do PhD para essas tarefa.

A maioria das proteínas identificadas no banco de dados demonstra estreita relação com os processos patológicos da DA ou a mecanismos fundamentais para a manutenção da plasticidade sináptica.

O clone C05 parece expor um epítopo semelhante a duas importantes moléculas ligadas ao funcionamento e manutenção da rede neural. A PLK4 é uma enzima quinase da família Polo-like. Essas enzimas atuam como reguladoras do ciclo celular, mitose e reparo de DNA (WINKLES et al., 2005). Em neurônios elas atuam principalmente em dendritos. Sua expressão

está relacionada à estabilização e manutenção da integridade das redes neurais por meio de um mecanismo de plasticidade homeostática que é ativado em momentos de intensa atividade neuronal (KAUSELMANN et al. 1999). Na DA a PLK2 está superexpressa nos neurônios do hipocampo e córtex ( HARRIS et al. 2000; MBEFO et al., 2010; SEEBURG et al., 2008). A relação da PLK4 com a DA não é descrita na literatura.

A neurexina 3 $\beta$  é uma molécula de adesão e um receptor neuronal fundamental para a maturação e manutenção das sinapses. Seu ligante é a neurologina e seu complexo com essa proteína é suficiente para induzir a diferenciação pré e pós sináptica em cultura (SUDLOF, 2008). A neurexina 3 $\beta$  é um substrato da  $\alpha$  e  $\gamma$  secretases, enzimas que atuam no processamento não amiloidogênico da PPA. Mutações da pré-senilina 1, componente da  $\gamma$ -secretase, estão relacionadas a casos familiares de DA pré-senil (BLOT et al., 2010).

O peptídeo do clone D04 apresenta região de alinhamento com sequência da neuroserpina e da proteína do Gene 2 de susceptibilidade para o Autismo (Auts2). A proteína codificada pelo Auts2 ainda tem função pouco conhecida mas está altamente expressa nos neurônios do córtex pré-frontal e cerebelo durante o neurodesenvolvimento (BEDOGNI et al. 2010). Não há relato de sua relação com a DA. A neuroserpina, um inibidor do ativador do plasminogênio tecidual exclusivo de neurônios, tem seus níveis aumentados no líquor de pacientes com DA (NIELSEN et al., 2007). Sua expressão também é aumentada em áreas relacionadas ao aprendizado e memória, em especial a camada CA1 do hipocampo e no córtex cerebral, e durante o neurodesenvolvimento (WU et al., 2010; MIRANDA; LOMAS, 2006; YAMADA et al., 2010). Estudos demonstram que a produção de neuroserpina aumenta em resposta a hipóxia e privação de glicose, tanto em cultura quanto em pacientes após acidente vascular cerebral isquêmico, podendo ser um marcador sérico de excitotoxicidade e ruptura da barreira hematoencefálica (RODRIGUES-GONZALES et al., 2011a; RODRIGUES-GONZALES et al., 2011b; WU et al., 2010). Apesar de ser proposto um papel neuroprotetor para a neuroserpina nas situações de isquemia e a sua capacidade de impedir a formação de placas maduras de A $\beta$  (KINGHORN et al. 2006), alguns autores relatam atividade aumentada da neuroserpina durante a DA e pior performance cognitiva em ratos que expressam a proteína (FABBRO; SCHALLER, 2011).

As sequências de quatro peptídeos entre os 10 selecionados para identificação (D11, E05, E11 e H09) se alinharam no BLAST com proteínas DNAJ-homólogas. Essas proteínas, também nomeadas como Hsp40, são co-chaperonas que atuam em complexo com a DNAK (Hsp70) no

enovelamento de proteínas para que elas adquiram a estrutura tridimensional correta (AHMAD et al., 2011; STERRENBERG et al. 2011). Sua expressão é maior no cérebro que outros tecidos (CHEETHAM et al. 1992). As proteínas DNAJ se ligam à Hsp70 estabilizando sua interação com o seu substrato e estimulam sua atividade de ATPase. (QIU et al., 2006) Alguns autores tem demonstrado que a Hsp70 impede a formação de agregados de amiloide e de outras proteínas relacionadas a doenças neurodegenerativas, tendo um papel neuroprotetor (EVANS et al. 2006; MUCKOWSKI et al., 2000; WACKER, 2004). Também foi descrita a presença de AAcS contra o membro 8 da subfamília C das DNAJs em estudos de *microarrays* de Acs no soro de pacientes com DA e do membro 6 da subfamília B como constituinte dos corpúsculos de Lewy na Doença de Parkinson ( DURRENBERGER et a. 2009; NAGELE et al., 2011).

Para o clone E05 também foi identificada similaridade com as proteínas PRUNE2 e MINT1/X11. A PRUNE2 está relacionada à manutenção do tecido neural diferenciado de forma ainda não determinada (IWAMA et al., 2011). O seu gene surge como gene de interesse na DA em estudos de varredura genômica (LI et al., 2011; POTKIN et al., 2009). A MINT1/X11 é uma proteína adaptadora expressa primariamente em neurônios que se liga à PPA e modula seu processamento (ROGELJ et al. 2006; OKAMOTO et al. 2011; SAKUMA et al., 2009). A contribuição da X11 para a formação do A $\beta$  ainda é controversa na literatura. Alguns estudos demonstram que a expressão de X11 é capaz de suprimir a produção de A $\beta$  e que sua disfunção leva a aumento da produção mesmo quando a atividade da  $\beta$ -secretase está normal (GROSS et al., 2008; LEE et al., 2003; SAITO et al., 2008; SAITO et al., 2011). Entretanto experimentos de deleção da X11 mostraram que isso atrasa a formação de placas de amiloide (HO; LIU; SUDHOF, 2008) e o silenciamento do seu gene (APBA1), utilizando RNA interferente, diminui a produção do A $\beta$  em culturas de neurônio (XIE; ROMANO; TANZI, 2005).

O peptídeo E11 se alinhou com o fator 6 associado ao receptor do TNF (TRAF 6), um importante componente de vias de indução de apoptose mediada pelo receptor p75 (YEISER et al., 2004). Não há associação descrita entre essa proteína e a DA mas estudos demonstraram seu envolvimento na Doença de Huntington, aumentando a formação de agregados de Huntingtina, e na Doença de Parkinson (ZUCCELLI et al., 2010; ZUCCELLI et al., 2011).

Para o mesmo peptídeo existe similaridade com a sequência do receptor  $\alpha$ 3 do fator neurotrófico derivado da glia (GDNF). O GDNF é um fator neurotrófico importante no desenvolvimento e manutenção do sistema nervoso central, principalmente nos neurônios

colinérgicos (STRATEN et al., 2009). Sua atuação ainda não é clara mas ele é capaz de proteger neurônios catecolaminérgicos de agentes tóxicos (PASCUAL et al. 2011). Nos pacientes com DA existe redução do GDNF no giro temporal medial (AIRAVAARA et al., 2011).

O alinhamento do peptídeo F10 levou a identificação da trombospondina 1 e de unidades do receptor nicotínico da acetilcolina. A trombospondina 1 é um fator antiangiogênico que impede a adesão das células endoteliais à matriz extracelular (MURPHY-ULLRICH; HÖÖK, 1989). Não há descrição do seu envolvimento com a DA.

As vias colinérgicas são extensamente comprometidas na DA pela atrofia dos neurônios do Núcleo Basal de Meynert (SCHLIEBS;ARENKT, 2011; TEIPEL et al., 2011). Foi descrito no soro de pacientes com DA a presença de AAcs contra subunidades dos receptores nicotínicos, em especial  $\alpha 4$  e  $\alpha 7$  (KOVAL et al., 2011). Perda consistente dos receptores colinérgicos, *in vivo* e *in vitro*, em especial  $\alpha 7$  é observada na DA (NORDBERG, 2001). A perda desses receptores pode levar a estados inflamatórios devido ao seu envolvimento no controle da liberação de citocinas, em especial TNF (PAVLOV et al., 2009). Entretanto não foi ainda descrito na literatura o envolvimento das unidades  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  e  $\alpha 6$ , que foram encontradas nesse trabalho, na DA.

Na identificação do clone G09 ocorreu alinhamento com a Enzima Conversora da Angiotensina. O gene que a codifica frequentemente é relacionado a maior risco para o desenvolvimento da DA (KEHOE et al., 2004; LUCATELLI et al., 2011; WANG et al., 2006). Para o clone G11 houve alinhamento com a neurabina-1, proteína que participa da formação de sinapses e regula a plasticidade em neurônios do hipocampo (NAKANISHI et al., 1997).

O peptídeo H11 se alinhou com o CD44. Essa molécula de adesão é um marcador de células precursoras de astrócitos. A literatura descreve o aumento do número de astrócitos e linfócitos expressando CD44 (AKIYAMA et al., 1993; UBERTI et al., 2010). O CD44 também pode ser clivado pela  $\gamma$ -secretase e dar origem a um pequeno peptídeo semelhante ao A $\beta$  (LAMMICH et al., 2002).

Muitos dos Ags descritos nesse trabalho não são citados na literatura no que diz respeito à presença de autoanticorpos aos quais sejam ligantes no soro. Segundo LEVIM et al. (2010), o achado de AAcs reativos a alvos cerebrais é um fenômeno frequente até mesmo em jovens. A barreira hematoencefálica impediria o acesso desses Acs ao cérebro impedindo sua ligação com os Ags. Entretanto é conhecida a alteração da permeabilidade dessa barreira na DA (VIGGARS,

2001; ZLOKOVIC, 2011), o que pode contribuir para o acesso de imunoglobulinas ao cérebro e sua participação no processo (DIAMOND et a., 2009).

Outra questão é o fato de que a extensa morte neuronal pode na verdade estar expondo epítotos anteriormente não disponíveis. Isso tornaria o achado desses Acs um epifenômeno e não um agente ativo no desenvolvimento da DA (NAGELE et al., 2011).

Nesse trabalho uma ampla variedade de moléculas é proposta como mimetopos de Ags específicos da DA. Como a amostra estudada tem tamanho reduzido, outros estudos com amostras maiores devem ser realizados com o fim de avaliar a especificidade e sensibilidade desses peptídeos para o diagnóstico da DA. Devem ser avaliadas tanto amostras de pacientes idosos que apresentem diagnóstico de outras demências e transtorno cognitivo leve quanto jovens. Esses peptídeos, se eficientes nessa discriminação, podem fazer parte de sensores em aplicativos diagnósticos.

A análise de bioinformática mostra que os peptídeos se alinham a várias proteínas, não sendo específicos mas miméticos a um conjunto de alvos que seriam reconhecidos pelos anticorpos.

Algumas doenças neuropsiquiátricas, como PANDAS e Síndrome Guillain Barré, tem origem com a formação de Acs cruzados, formados contra Ags bacterianos mas capazes de se ligar com moléculas próprias do tecido neural por identificarem mimetopos nessas proteínas (LECKMAN et al., 2011; SHAHRIZAILA;YUKI, 2011). A associação da DA com microorganismos não é desconhecida. Alguns estudos tem demonstrado a presença de *Chlamydia pneumoniae* no córtex pré-frontal de pacientes com DA (HAMMOND et al. 2010). Também são sugeridas relações com infecção pelo vírus Herpes Simples Tipo 1 e espiroquetas (HOLMES; COTTERELL, 2009). Por isso é válido investigar a possibilidade de alguns AAcs encontrados no soro terem sido originalmente produzidos em resposta à exposição a vários outros Ags ao longo da vida mas sejam capazes de se ligar a alvos neurais que ficariam expostos devido as alterações de permeabilidade da barreira hematoencefálica.

## 6 - CONCLUSÃO

O processo de seleção de peptídeos expostos em bacteriófagos permitiu identificar mimetopos de diversas proteínas relacionadas a mecanismos de plasticidade neuronal, receptores de neurotransmissores e proteínas codificadas por genes candidatos para a DA. Como a seleção foi realizada a partir de imunoglobulinas G capturadas por micropartículas magnéticas pode-se formular a hipótese de que existem autoanticorpos no soro dos pacientes com DA dirigidos a抗ígenos específicos do sistema nervoso central.

A validação dos peptídeos mais reativos na avaliação inicial deve ser realizada com maior número amostral em um estudo delineado para estabelecer a sensibilidade e especificidade quanto ao diagnóstico de DA e diferencial com outras formas de demência.

Os resultados desse estudos podem ainda originar novas hipóteses de trabalho na investigação das relações entre sistema imune e nervoso no desenvolvimento da DA, origem e ação desses possíveis autoanticorpos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, A. et al. Heat shock protein 70 kDa chaperone/DnaJ cochaperone complex employs an unusual dynamic interface. **PNAS**. v. 108, n. 47, p. 18966-18971. 2011.

AMIEVA, H. et al. Prodromal Alzheimer's Disease: Successive Emergence of the Clinical Symptoms. **Annals Neurology**. v. 64, p. 492–498. 2008.

AIRAVAARA,M. et al. Identification of novel GDNF isoform and cis-antisense GDNFOS gene and their regulation in human middle temporal gyrus of Alzheimer disease. **Journal of Biological Chemistry**. v. 286, p. 45093-45102. 2011.

AKIYAMA, H. Morphological diversities of CD44 positive astrocytes in the cerebral cortex of normal subjects and patients with Alzheimer's disease. **Brain Research**. v. 632, n. 1, p. 249-59. 1993.

ALBERT, M.S. et al. The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the national Institute on aging. Alzheimer's association workgroup on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. **Alzheimer & Dementia**. v.7, n.3, p.270-279. 2011.

AMADUCCI,L.A. et al. Origin of distinction between Alzheimer's disease and senile dementia. **Neurology**.v.36,n.11,p.1497- .1986.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION - APA. **Manual diagnóstico e Estatístico de transtornos mentais**. Trad. Cláudia Dornelles; 4<sup>a</sup> ed. Porto Alegre; ArtMed. 2002.

ANDERSON,G.F.HUSSEY,P.S. Population aging: comparision among industrialized countries. **Health Affairs**. v.19,n.3,p.191-203. 2000.

BACHMAN,D.L. et a. Prevalence of dementia and probable senile dementia of the Alzheimer type in the Framingham Study. **Neurology**. v.42,n.1,p. 1992.

BACHMEIER, C.J. et al. Epitope-dependent effects of beta-amyloid antibodies an beta-amyloid clearance in an in vitro model of the blood-brain barrier. **Microcirculation**. v.18, n. 5, p. 373-379. 2011.

BARBAS, C.F.III, et al. **Phage Display: A Laboratory Manual**. Plain View, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

BEDOGNI, F. et al. Autism susceptibility candidate 2 (Auts2) encodes a nuclear protein expressed in developing brain regions implicated in autism neuropathology. **Gene Expression Patterns**. v. 10, n. 1, p. 9-15. 2010.

BOURAS, C. et al. Humoral immunity in brain aging and Alzheimers disease. **Brain Research Reviews**. v. 48, p. 477-487. 2005.

BOWLER, J.V. et al. Comparative evolution of Alzheimers disease, vascular dementia and mixed dementia. **Archieves of Neurology**. v. 54, n. 6. 1997.

BLOT, N. et al. Processing of the Synaptic Cell Adhesion Molecule Neurexin-3 $\beta$  by Alzheimer Disease  $\alpha$ - and  $\gamma$ -Secretases. **Journal of Biological Chemistry**. v. 286, n. 4. p. 2762-2773. 2010.

BRUNNSTRON,H. et al. Prevalence of dementia subtypes: A 30-year retrospective survey of neuropathological reports. **Archieves of Gerontology and Geriatrics**. v.49,n.1,p.146-149. 2009.

CARLSSON.A. Brain neurotransmitters in aging and dementia: similar changes across diagnostic dementia groups. **Gerontology**.v.33,n.3-4,p.159-167.1987.

CARVALHO,J.A, GARCIA,R.A. O envelhecimento da população brasileira: um enfoque demográfico. **Cadernos de Saúde Pública**. v.19,n.3,p.725-733. 2003.

CHAIMOWICZ,F. A saúde dos idosos brasileiros às vésperas do século XXI: problemas, projeções e alternativas. **Rev.Saúde Pública.** v.31,n.2,p.184-200.1997.

CHEETHAM, M.E. BRION, J.P. ANDERTON, B.H. Human homologues of the bacterial heat-shock protein DnaJ are preferentially expressed in neurons. **Biochemistry Journal.** v. 284, p. 469-476. 1992.

CIPRIANI,G. et al. Alzheimer and his disease: a brief history. **Neurological science.** v.32,p.275-279.2011.

COLASSANTI, T. et al. Autoantibodies in patients with Alzheimer's disease: pathogenetic role and potential use as biomarkers of disease progression. **Autoimmun Rev.** n. 9, p. 807-811. 2010.

CORTESE, R. et al. Epitope discovery using peptide library displayed on phage. **TRENDS Biotechnology.** v.12, n.7, p. 262-267. 1994.

DANIILIDOU, M. et al. Detection of elevated antibodies against SR protein Kinase 1 in the serum of Alzheimer's disease patients. **Jounal of Neuroimmunology.** v. 238, n. 1, p. 67-72. 2011.

DAVYDOVA,T.V. et al.. Production of autoantibodies to glutamate during Alzheimer's dementia. **Bulletin of Experimental Biological Medicine.** v. 147, n. 4, p. 405-407. 2009.

DE FELICE, F.G. et al. Protection of synapses against Alzheimer's-linked toxins: Insulin signaling prevents the pathogenic binding of A $\beta$  oligomers. **PNAS.** v.106, n.6, p.1971-1976. 2009.

DE LA MONDE,S.M. Quantification of cerebral atrophy in pre-clinical and end-stage Alzheimer's disease. **Annals of Neurology.** v.25,n.5,p.450-459. 1989.

DEANE, R. et al. Clearance of amyloid- $\beta$  peptide across the blood-brain barrier: implication for therapies in Alzheimers disease. **CNS Neurological Disorders Drug Targets**. v. 8, n. 1, p. 16-30. 2009.

DIAMOND, B. et al. Losing your nerves? Maybe it's the antibodies. **Nature reviews Immunology**. v. 9, p. 449-456. 2009.

DODEL, R. et al. Naturally occuring autoantibodies against  $\beta$ -amyloid: investigating their role in transgenic animal and in vitro models of Alzheimer's disease. **The Journal of Neuroscience**. v. 31, n. 15, p. 5847-5854. 2011.

DURRENBERGER, P.F. et al. DnaJB6 is present in the core of Lewy bodies and is highly up-regulated in parkinsonian astrocytes. **Journal of Neuroscience Research**. v. 87, n. 1, p. 238-245. 2009.

ERKINJUNTTI, T. et al. The effect of different diagnostic criteria on the prevalence of dementia. **New England Journal of Medicine**. n.337, p.1667-1674. 1997.

ETEBEN, J.A. Living with the enemy: a physiological role for the  $\beta$ -amyloid peptide. **TRENDS in Neuroscience**. v.27, n.1, p. 1-3. 2004.

EVANS, C.G. WISÉN, S. GESTWICKI ,J.E. Heat shock proteins 70 and 90 inhibit early stages of amyloid beta-(1-42) aggregation in vitro. **Journal of Biological Chemistry**. v. 281, n. 44, p. 33182 -33191. 2006.

FABBRO, S. SCHALLER, K. SEEDS, N.W. Amyloid-beta levels are significantly reduced and spatial memory defects are rescued in a novel neuroserpin-deficient Alzheimer's disease transgenic mouse model. **Journal of Neurochemistry**. v. 118, n. 5, p. 928- 938. 2011.

FAGUNDES, S.D. et al. Prevalence of dementia among elderly Brazilians: a systematic review. **São Paulo Medical Journal**. v. 129, n. 1, p. 46-50. 2011.

FERRI,C.P. et al. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. **The Lancet**. v.366,n.9503,p.2112-2117. 2005.

FOX,N.C. SCHOTT,J.M. Imaging cerebral atrophy: normal aging to Alzheimer's disease. **The Lancet**. v.363,p.392-394.2004.

GAMBLIN, T.C. et al. Caspase cleavage of tau: Linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. **PNAS**. v. 100, n. 17, p.10032-10037. 2003.

GOEDERT,M. GHETTI,B. Alois Alzheimer: his life and times. **Brain Pathology**.n.17,p.57-62.2007.

GOLDBOLT,A.K. et al. The natural history of Alzheimer disease. A longitudinal pre-syntomatic and syntomatic study of familial cohort. **Archives os Neurology**. v.61,p.1743-1748.2004.

GROSS, G.G. Role of X11 and ubiquilin as in vivo regulators of the amyloid precursor protein in Drosophila. **PLoS One**. v. 3, n. 6, p. e2495. 2008.

GUNNING-DIXON,F.M. et al. Aging of cerebral white matter: a review of MRI findings. **International Journal of Geriatric Psychiatric**.v.24,n.2,p.109-117.2009.

GUSTAW-ROTHENBERG, R. et al. Biomarkers in Alzheimer's disease: past, present and future. **Biomarkers Medicine**. v. 4, n. 1, p. 15-26. 2010.

HAMMOND, C.J. et al. Immunohistological detection of Chlamydia pneumoniae in the Alzheimer's disease brain. **BMC Neuroscience**. v. 11, p. 121. 2010.

HAMPEL, H. et al. Core candidate neurochemical and imaging biomarkers of Alzheimer's disease. **Alzheimer's & Dementia**. v. 4, p. 38-48. 2008.

HARRIS, P.L.R. et al. Neuronal polo-like kinase in Alzheimer disease indicates cell cycle

changes. **Neurobiology of Aging**. v. 21, n. 6, p. 837-841. 2000.

HENEKA, M.T. et al. Neuroinflammatory process in Alzheimer's disease. **Journal of Neural Transmission**. v. 117, n. 8, p. 919-947. 2010.

HENEKA, M.T. et al. Neuroglia in neurodegeneration. **Brain Research Review**. v. 63, p. 180-211. 2010.

HERBERT,L.E. et al. Alzheimer disease in the US population. Prevalence estimates using the 2000 census. **Archives of Neurology**. v.60, p.1119-1122.2003.

HERRERA,R.J. et al. Epidemiologic survey of dementia in a community-dwelling Brazilian population. **Alzheimer Disease and Associated Disorders**. n.16,v.2,p.103-108. 2002

HO, A. LIU, X. SÜDHOF, T.C. Deletion of Mint proteins decreases amyloid production in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. **Journal of Neuroscience**. v. 28, n. 53, p. 14392-14400. 2008.

HOFFMAN, A. et al. The prevalence of dementia in Europe: a collaborative study of 1980-1990 findings. EURODEM prevalence research group. **International Journal of Epidemiology**. n. 20, v. 3, p 736-748. 1991.

HOLMES, C. COTTERELL ,D. Role of infection in the pathogenesis of Alzheimer's disease: implications for treatment. **CNS Drugs**. v. 23, n. 12, p. 993-1002. 2009.

HOOGENBOON, H.R. et al. Antibody phage display technology and its applications. **Immunotechnology**. v. 4, n. 1, p. 1-20. 1998.

HUANG, J. et al. Bioinformatics resources and tools for phage display. **Molecules**. v. 16, p. 694-709. 2011.

IWAMA, E. et al. Cancer-related PRUNE2 protein is associated with nucleotides and is highly expressed in mature nerve tissues. **Journal of Molecular Neuroscience**. v. 44, n. 2, p. 103-114. 2011.

JACK,C.R. et al. The rate of medial temporal lobe atrophy in typical aging and Alzheimer's disease. **Neurology**. n.51,v.4,p.993-999.1998.

JELLINGER, K.A. Alzheimer 100 - highlights in the history of Alzheimer research. **Journal of Neural Transmission**. v. 113, p. 1603-1623. 2006.

JONSSON,L. et al. Determinants of costs of care for patients with Alzheimer's disease. **International Journal of Geriatric Psychiatry**. v.21, p.449-459. 2006.

JOST, B.C. GROSSBERG, C.T. The evolution of psychiatric symptoms in Alzhiemers disease: a natural history study. **Journal of American Geriatric Association**. v. 44, n. 9, p. 1078-1081. 1996.

KANDELWAL,P.J. et al.. Inflammation in the early stages of neurodegenerative pathology. **Jounal of Neuroimmunology**. v. 238, p. 1-11. 2011.

KAUSEKMANN, G. et al. The polo-like protein kinases Fnk and Snk associate with a  $\text{Ca}^{2+}$ - and integrin-binding protein and are regulated dynamically with synaptic plasticity. **EMBO Journal**. v. 18, n. 20, p. 5528-5538. 1999.

KEHOE, P.G. et al. Common variants of ACE contribute to variable age-at-onset of Alzheimer's disease. **Human Genetics**. v. 114, n. 5, p. 478-483. 2004.

KELLNER, A. et al. Autoantibodies against beta-amyloid are commun in Alzheimer's disease and health control plaque burden. **American Neurology**. v. 65, n. 1, p. 24-31. 2009.

KINGHORN, K.J, et al. Neuroserpin binds Abeta and is a neuroprotective component of

amyloid plaques in Alzheimer disease. **Journal of Biological Chemistry**. v. 281, n. 39, p. 29268-29277. 2006.

KINSELLA, K. VELKOFF, V.A. US **Census Bureau Series**. An aging world: 2001. US goverment printing Office, Washington, DC. 2001.

KINSELLA, K. PHILLIPS, D.R. Global Aging: The Challenge of Succes. **Population Bulletin**, v. 60, n.1. 2005.

KINSELLA, K. et al. **U.S. Census Bureau, International Population Reports**, P95/09-1, An Aging World: 2008, U.S. Government Printing Office, Washington, DC,2009.

KOVAL,L. et al. The presence and origen of autoantibodies against  $\alpha$ 4 e  $\alpha$ 7 nicotinic acetylcholine receptors in the human blod: possible relevance to Alzheimer's pathology. **Journal of Alzheimers Disease**.v. 25, n. 4, p. 747-761. 2011.

KRIPLANI, V. KAY, B.K. Selecting peptides for use in nanoscales materials using phage displayed combinatorial peptide libraries. **Current Opinion Biotechnology**. v.16, n. 4, p. 470-475. 2005.

LAMMICH, S. et al. Presenilin-dependent intramembrane proteolysis of CD44 leads to the liberation of its intracellular domain and the secretion of an Abeta-like peptide. **Journal of Biological Chemistry**. v. 277, n. 47, p. 44754-44759. 2002.

LANE, D.P. STEPHEN, C.W. Epitope mapping ussing bacteriophage peptide libraries. **Current Opinion in Biotechnology**. v.5, n.2, p.268-271. 1993.

LECKMAN, J.F. et al. Streptococcal upper respiratory tract infections and exacerbations of tic and obsessive-compulsive symptoms: a prospective longitudinal study. **Journal of American Academy Child and Adolescent Psychiatry**. v. 50, n. 2, p. 108-118. 2011.

LEE, J.H. et al. The neuronal adaptor protein X11alpha reduces Abeta levels in the brains of Alzheimer's APPswe Tg2576 transgenic mice. **Journal of Biological Chemistry**. v. 278, n. 47, p. 47025-47029. 2003.

LETENNEUR, L. et al. Education and the risk for Alzheimer's disease: sex makes a difference. EURODEM pooled analyses. Eurodem incidence research group. **American Epidemiology**. v. 151, n. 11, p. 1064-1071. 2000.

LEVIN, E.C. et al. Brain-reactive autoantibodies are nearly ubiquitous in human sera and may be linked to pathology in the context of blood-brain barrier breakdown. **Brain Research**. n. 1345, p. 221-232. 2010.

LEVY, M.L. et al. Longitudinal assessment of symptoms of depression, agitation and psychosis in 181 patients with Alzheimer's disease. **American Journal of Psychiatry**. v. 153, n. 11, p. 1438-1443. 1996.

LI, S. The expression and localization of Prune2 mRNA in the central nervous system. **Neuroscience Letters**. v. 503, n. 3, p. 208-214. 2011.

LIU, L. et al. Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity. **Science**. v. 304, n. 5673, p. 1021-1024. 2004.

LOPES, M.A. BOTTINO, C.M.C. Prevalência de demência em diversas regiões do mundo. Análise dos estudos epidemiológicos de 1994 a 2000. **Arquivos de Neuropsiquiatria**. v. 60, n. 1, p. 61-69. 2002.

LUCATELLI, J.F. et al. Genetic influences on Alzheimer's disease: evidence of interactions between the genes APOE, APOC1 and ACE in a sample population from the South of Brazil. **Neurochemistry Research**. v. 36, n. 8, p. 1533-1539. 2011.

MATTSON, M.P. CHAN, S.L. DUAN, W. Modification of brain aging and neurodegenerative disorders by genes, diet and behavior. **Physiology Review**. n.82, p.637-672. 2002.

MCKHANN, G.M. et al. Clinical diagnoses of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA work group under the auspices of department of Health and Human Services task force for Alzheimer's disease. **Neurology**. v.34, p.939-941. 1984.

MCKHANN, G.M. et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendation from the National Institute on Aging- Alzheimer's association work groups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. **Alzheimer & Dementia**. v.7, n.3, p. 263-269. 2011.

MAYEUX, R et al. Plasma A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42 and Alzheimer's disease. Relation to age, mortality and risk. **Neurology**. n.61, p.1185-1190. 2003.

MBEFO, M.K. et al. Phosphorylation of Synucleins by Members of the Polo-like Kinase Family. **Journal of Biological Chemistry**. v. 285, n. 4, p. 2807-2822. 2010.

MEHTA, P.D. et al. Plasma and cerebrospinal fluid levels of amyloid  $\beta$  protein 1-40, 1-42 in Alzheimer disease. **Archives of Neurology**. v.57. 2000.

MIRANDA, E. LOMAS, D.A. Neuroserpin: a serpin to think about. **Cell Molecular Life Science**. v. 63, n. 6, p. 709-722. 2006.

MOLEK, P. STRUKELJ, B. BRATKOVIC, T. Peptide phage display as a tool for drug discovery: targeting membrane receptors. **Molecules**. v. 16, n. 1, p. 857-887. 2011.

MONTAÑO, M.B.M.M. RAMOS, L.R. Validade da versão em português da Clinical Dementia Rating. **Revista de Saúde Pública**. v.39, n.6, p. 912-917. 2005.

MOTTA, L.B. AGUIAR,A.C. Novas competências profissionais em saúde e o envelhecimento populacional brasileiro: integralidade, interdisciplinaridade e intersetorialidade. **Ciência e Saúde Coletiva**. v.12, n.2, p.363-373. 2007.

MUCHOWSKI, P.J. Hsp70 and hsp40 chaperones can inhibit self-assembly of polyglutamine proteins into amyloid-like fibrils. **PNAS**. v. 97, n. 14, p. 7841-7846. 2000.

MURPHY-ULLRICH, J.E. HÖÖK ,M. Thrombospondin modulates focal adhesions in endothelial cells. **Journal of Cellular Biology**. v. 109, n. 3, p.. 1309-1319.

NAGELE, E. et al. Diagnosis of Alzheimer's disease based on disease-specific autoantibody profiles in human sera. **PLOS One**. v.6, n. 8, p.e23112. 2011.

NAKANISHI, H. et al. Neurabin: A Novel Neural Tissue-specific Actin Filament-binding Protein Involved in Neurite Formation. **Journal Cellular Biology**. v. 139, n. 4, p. 951-961. 1997.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **The Aging Mind: Opportunities in Cognitive Research. Committee on Future Directions for Cognitive Research on Aging**. Paul C. Stern and Laura L. Carstensen, editors. Commission on Behavioral and Social Sciences and Education. Washington, DC: National Academy Press. 2000.

NEFF,F. et al.. Immunotherapy and naturally accuring autoantibodies in neurodegenerative disorders. **Autoimmunity Reviews**.v. 7, p. 501-507. 2008.

NIELSEN, H.M. et al. Plasma and CSF serpins in Alzheimer disease and dementia with Lewy bodies. **Neurology**. v. 69, n. 16, p. 1569-1579. 2007.

NITRINI, R.N. et al. Diagnóstico de Doença de Alzheimer no Brasil. Critérios diagnósticos e exames complementares. Recomendações do Departamento Científico de Neurologia cognitiva e

do envelhecimento da Academia Brasileira de Neurologia. **Arquivos de Neuropsiquiatria**. v.63, p.713-719. 2005.

NITRINI, R.N. et al. Diagnóstico de Doença de Alzheimer no Brasil. Avaliação cognitiva e funcional. Recomendações do Departamento Científico de Neurologia cognitiva e do envelhecimento da Academia Brasileira de Neurologia. **Arquivos de Neuropsiquiatria**. v.63, p.720-727. 2005.

NORDBERG, A. Nicotinic receptor abnormalities of Alzheimers disease: therapeutic implications. **Biological Psychiatry**. v. 49, n. 3, p. 200-210. 2001.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - OMS. **Classificação de Transtornos Mentais e de Comportamento da CID-10: descrições clínicas e diretrizes diagnósticas**. trad. Dorgival Caetano. Porto Alegre: Artes Médicas, 1993. 351 p.

OKAMOTO, M. et al. Amyloid precursor protein associates independently and collaboratively with PTB and PDZ domains of mint on vesicles and at cell membrane. **Neuroscience**. v. 104, n. 3, p. 653-665. 2001.

OLESEN,J. et al. The economic cost of brain disorders in Europe. **Europe Journal of Neurology**. v.19,n.1,p.155-162.2012.

OLSSON, A. et al. Measurement of a e b secretase cleaved amyloid precursor protein in cerebrospinal fluid from Alzheimer patients. **Experimental Neurology**. v.183, p. 77-80. 2003.

OTT,A. et al. Prevalence os Alzheimer's disease and vascular dementia: association with education. The Rotterdam study. **British Medical Journal**. v. 310,p.970-973. 1995.

PANDE, J. et al. Phage Display concept, innovations, applications and future. **Biotechnology Advances**. v. 28, n.6, p. 849-858. 2010.

PASCUAL, A. et al. GDNF and protection of adult central catecholaminergic neurons. **Journal Molecular Endocrinology**. v. 46, p. R83-R92. 2011.

PAUL, S. PLANQUE, S. NISHIYAMA, Y. Immunological origin and functional properties of catalytical autoantibodies to amyloid b peptide. **Journal of Clinical Immunology**. v.30, suppl. 1, p. 543-549. 2010.

PANNESE.E. Morphological changes in nerve cells during normal aging. **Brain Structure and Function**. n.216,p.85-89.2011.

PAVLOV, V.A. et al. Brain acetylcholinesterase activity controls system cytokine levels though the colinergic antinflamatory pathway. **Brain Behaviour immunity**. v. 23, n. 1, p. 41-45. 2009.

POTKIN, S.G. et al. Hippocampal atrophy as a quantitative trait in a genome-wide association study identifying novel susceptibility genes for Alzheimer's disease. **PLoS One**. v. 4, n. 8, p. e6501. 2009.

PRATA,P.R. A transição epidemilógica no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**. v.8, n.2, p.168-175. 1992.

QIU, X.B. The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. **Cell Molecular Life Science**. v. 63, n. 22, p. 2560-2570. 2006.

RADER, C. BARBAS III, C.F. Phage Display of combinatorial antibody libraries. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 8, n. 4, p. 503-508. 1997.

RAZ,N.RODRIGUES,K.M. Differential aging of the brain: patterns, cognitive correlates and modifiers. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. v.30,p.730-748.2006.

RINNE,J.O. LOMBERG,P. MARJAMAKI,P. Age dependent decline in human brain dopamine D1 and D2 receptors. **Brain Research**. v.508,n.2,p.349-352. 1990.

RISSMAN, R.A. et al. Caspase-cleavage of tau is an early event in Alzheimer disease tangle pathology. **The Journal of Clinical Investigation.** v. 114, n. 1, p. 121-130. 2004.

ROCCA, W.A. et al . Frequency and distribution of Alzheimer's disease in Europe: a collaborative study of 1980-1990 prevalence findings. **The Eurodem prevalence research group. Annals Neurology.** v. 30, n. 3, p. 381-390. 1991.

RODI,D. et al. Quantitative assessment of peptide sequence diversity in M13 combinatorial peptide Phage Display Libraries. **Journal of Molecular Biology.** v. 322, p. 1039-1052. 2002.

RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ R. et al. Neuroprotective effect of neuroserpin in rat primary cortical cultures after oxygen and glucose deprivation and tPA. **Neurochemical International.** v. 58, n. 3, p. 337-343. 2011.

RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, R. Association between neuroserpin and molecular markers of brain damage in patients with acute ischemic stroke. **Journal of Translational Medicine.** v. 9, n. 58. 2011. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3113955/pdf/1479-5876-9-58.pdf> - acesso em 30 de janeiro de 2012).

ROGELJ, B. The X11/Mint family of adaptor proteins. **Brain Research Review.** v. 52, n.2, p. 305-315. 2006.

ROWLEY, M.J. O'CONNOR, K. WIPEYEWICKREURA, L. Phage display for epitope determination: paradigm for identifying receptor-ligand interation. **Biotechnology Annual Review.** v.10, p151-188. 2004.

SAITO, Y. et al. X11 proteins regulate the translocation of amyloid beta-protein precursor (APP) into detergent-resistant membrane and suppress the amyloidogenic cleavage of APP by beta-site-cleaving enzyme in brain. **Journal of Biological Chemistry**. v. 283, n. 51, p. 35763-35771. 2008

SAITO, Y. et al. Intracellular trafficking of the amyloid  $\beta$ -protein precursor (APP) regulated by novel function of X11-like. **PLoS One**. v. 6, n. 7, p. e22108. 2011.

SAKUMA, M. et al. Phosphorylation of the amino-terminal region of X11L regulates its interaction with APP. **Journal of Neurochemistry**. v. 109, n. 2, p. 4465-475. 2009.

SCAZUFA, M. et al. Investigações epidemiológicas sobre demências nos países em desenvolvimento. **Revista de Saúde Pública**. v. 36, n. 6, p. 773-778. 2002.

SCHLIEBS,R. ARENDT,T. The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. **Behavior Brain Research**. v. 221, n. 2, p. 555-563. 2011.

SCHRAMM,J.M.A et al. Transição epidemiológica e o estudo da carga de doença no Brasil. **Ciência e Saúde Coletiva**. v.9, n.4, p.897-908. 2004.

SEEBURG, D.P. et al. Critical Role of CDK5 and Polo-like Kinase 2 in Homeostatic Synaptic Plasticity during Elevated Activity. **Neuron**. v. 58, n. 4, p. 571-583. 2008.

SEGOVIA,G. et al. Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. **Mechanisms of aging and development**. n.122,p.1-29.2001.

SERRANO-POZZO,A. et al. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. **Cold Spring Harb. Perspective Medicine**. v.1a006189. 2011.

SHAHRIZAILA, N. YUKI, N. The role of immunotherapy in Guillain-Barré syndrome: understanding the mechanism of action. *Expert Opinion Pharmacotherapy*. v. 12, n. 10, p. 1551-1560. 2011.

SMITH, G.P. Surface presentation of protein epitopes using bacteriophage expression systems. *Current Opinion Biotechnology*. v.2, n.5, p.668-673. 1991.

STEVENS,T. et al. Islington study of dementia subtypes in the community. **British Journal of Psychiatry**. v.199,n.6,p.270-276.2002.

STERRENBERG, J.N. BLATCH, G.L. EDKINS, A.L. Human DNAJ in cancer and stem cells. *Cancer Letters*. v. 312, n. 2, p. 129-142. 2011.

STRATEN,G et al. Glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF) concentrations in cerebrospinal fluid and serum of patients with early Alzheimers disease and normal controls. *Journal of Alzheimers Disease*. 18, 331-337. 2009.

SÜDHOF, T.C. Neuroligins and Neurexins Link Synaptic Function to Cognitive Disease. *Nature*. v. 455, n. 7215, p. 903-911. 2008.

TAKASHIMA, A. Tau aggregation is a therapeutic target for Alzheimer's disease. **Current Alzheimer Research**. v. 7, n. 8, p. 665-669. 2010.

TEIPEL,S.J. et al. The cholinergic system in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: a in vivo MRI and DTI study. *Human Brain Mapping*. v. 32, n. 9, p. 1349-1362. 2011.

TISSERAND,D.J. JOLLES,J. On the involvement of the prefrontal network in cognitive ageing. *Cortex*. n.39,p.1107-1128.2003.

UBERTI, D. et al. Increased CD44 gene expression in lymphocytes derived from Alzheimer disease patients. *Neurodegenerative Disease*. v. 7, n. 1, p. 143-147. 2010.

UNITED NATIONS. **World population aging 2009**. Department of Economic and Social Affairs:Population Division. New York. 2010.

VACIRCA,D. et al.. Anti-ATP synthase autoantibodies from patients with Alzheimer's disease reduce extracellular HDL level. **Jounal of Alzheimers Disease**. v. 26, n. 3, p. 441-445. 2011.

VANA, L. et al. Progression of tau pathology in cholinergic Basal forebrain neurons in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. **American Journal of Pathology**. v. 179, n. 5, p. 2533-2550. 2011.

VERAS, R. Envelhecimento populacional contemporâneo: demandas, desafios e inovações. *Revista de Saúde Pública*. v. 43, n. 3, p. 548-554. 2009.

VIGGARS, A.P. Alterations in the blood brain barrier in ageing cerebral cortex in relationship to Alzheimer-type pathology: a study in the MRC-CFAS population neuropathology cohort. **Neuroscience Letters**. v. 505, n. 1, p. 25-30. 2011.

WACKER, J.L. et al. Hsp70 and Hsp40 attenuate formation of spherical and annular polyglutamine oligomers by partitioning monomer. **Nature Structural and Molecular Biology**. v. 11, p. 1101-1106. 2004.

WANG, H.K. et al. Apolipoprotein E, angiotensin-converting enzyme and kallikrein gene polymorphisms and the risk of Alzheimer's disease and vascular dementia. **Journal of Neural Transmission**. v. 113, n. 10, p. 1499-1509. 2006.

WEI, W. et al. Amyloid beta from axons and dendrites reduces local spine number and plasticity.

**Nature Neuroscience**, v. 13, n. 2, p. 190-196. 2009.

WILSON, R. et al. Cognitive decline in prodromal Alzheimer disease and mild cognitive impairment. **Archives of Neurology**. v. 68, n. 3, p. 351-356. 2011.

WINKLES, J.A. ALBERTS, G.F. Differential regulation of polo-like kinase 1, 2, 3, and 4 gene expression in mammalian cells and tissues. **Oncogene**. v. 24, p. 260-266. 2005.

WONG,D.F. et al. Effect of age on dopamine and serotonin receptors measured by positron tomography in the living human brain. **Science**. v.226,n.4681,p.1393-1396.1984.

WONG,L.L.CARVALHOJ.A. O rápido processo de envelhecimento populacional do Brasil: sérios desafios para as politicas públicas. **Revista Brasileira de Estudos Populacionais**. v. 23, n. 1, p. 5-26. 2006.

WU, J. et al. Neuroserpin protects neurons from ischemia-induced plasmin-mediated cell death independently of tissue-type plasminogen activator inhibition. **American Journal of Pathology**. v. 177, n. 5, p. 2576-84. 2010.

XIE, Z. ROMANO, D.M. TANZI, R.E. RNA interference-mediated silencing of X11alpha and X11beta attenuates amyloid beta-protein levels via differential effects on beta-amyloid precursor protein processing. **Journal of Biological Chemistry**. v. 280, n. 15, p. 15413-15421. 2005.

YAMADA M et al. Neuroserpin is expressed in early stage of neurogenesis in adult rat hippocampus. **Neuroreport**. v. 21, n. 2, p. 138-142. 2010.

YEISER, E.C. et al. Neurotrophin signaling through the p75 receptor is deficient in traf6-/-

mice. **Journal of Neuroscience**. v. 24, n. 46, p. 10521-10529. 2004.

ZHANG,Z.X. et al. Dementia subtypes in China. **Archives of Neurology**. v.62,n.3,p.447-453. 2005.

ZLOKOVIC, B.V. Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. **Nature Neuroscience Review**. v. 12, n. 12, p. 723-738. 2011.

ZUCCHELLI, S. TRAF6 promotes atypical ubiquitination of mutant DJ-1 and alpha-synuclein and is localized to Lewy bodies in sporadic Parkinson's disease brains. **Human Molecular Genetics**. v. 19, n. 19, p. 3759-3770. 2010.

ZUCCHELLI, S. et al. Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) associates with huntingtin protein and promotes its atypical ubiquitination to enhance aggregate formation. **Journal of Biological Chemistry**. v. 286, n.28, p. 25108-25117. 2011.

## ANEXO 1

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado para participar da pesquisa “QUANTIFICAÇÃO DOS PEPTÍDIOS DERIVADOS DA PROTEÍNA PRECURSORA DO AMILÓIDE (APP) NO PLASMA DE PACIENTES PORTADORES DE DEMÉNCIA DO TIPO ALZHEIMER”, sob a responsabilidade dos pesquisadores Luiz Ricardo Goulart Filho, Carlos Ueira Vieira, Luiz Carlos de Oliveira Júnior e Luiz David Finotti Carrijo.

Nesta pesquisa nós estamos buscando entender o funcionamento de algumas proteínas envolvidas na Doença de Alzheimer. Para tanto, será colhida uma amostra de 5 ml (um tubo) de sangue.

Na sua participação nós iremos medir, no sangue colhido, as moléculas que queremos estudar para entender melhor seu comportamento normal e na Doença de Alzheimer.

Em nenhum momento você será identificado. Os resultados da pesquisa serão publicados e ainda assim a sua identidade será preservada.

Você não terá nenhum gasto ou ganho financeiro por participar na pesquisa.

Os riscos são o de algum desconforto ou náusea durante a retirada da amostra de sangue. Em nenhum momento você será colocado em situação de risco. Não haverá benefício direto para você, embora você contribua diretamente para o entendimento da Doença de Alzheimer.

Você é livre para parar de participar a qualquer momento sem nenhum prejuízo para o senhor(a) ou seu acompanhamento clínico.

Uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com o senhor(a).

Qualquer dúvida a respeito da pesquisa o senhor(a) poderá entrar em contato com:

**Pesquisadores: Instituto de Genética e Bioquímica – Laboratório de Nanobiotecnologia** Av. Pará, 1720 - Bloco E, Sala 2E24 - Campus Umuarama -Uberlândia-MG Cep: 38400-902 Fone: (34) 3218-2478

CEP/UFU: Av. João Naves de Ávila, nº 2121, bloco J, Campus Santa Mônica – Uberlândia –MG, CEP: 38408-100; fone: 34-32394531

Uberlândia, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_

---

Assinatura dos pesquisadores

Eu aceito participar do projeto citado acima, voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecido

---

Participante da pesquisa