**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

JOHNATHAN DE ANDRADE VIEIRA

**Estresse oxidativo e alterações nos perfis de expressão gênica em
idosos com comprometimento cognitivo leve**

Ribeirão Preto

2019

JOHNATHAN DE ANDRADE VIEIRA

**Estresse oxidativo e alterações nos perfis de expressão gênica em
idosos com comprometimento cognitivo leve**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área de concentração: Genética.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Elza Tiemi Sakamoto Hojo

**Ribeirão Preto
2019**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Vieira, Johnathan de Andrade

Estresse oxidativo e alterações nos perfis de expressão gênica em idosos com comprometimento cognitivo leve/ Ribeirão Preto, 2019.

80f.: il.; 30 cm

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Genética.

Orientadora: Sakamoto-Hojo, Elza Tiemi.

Palavras-chave: comprometimento cognitivo leve, estresse oxidativo, ciclo celular, dano e reparo do DNA, alterações mitocondriais, envelhecimento.

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes entidades e instituições:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Bolsa de mestrado – Processo nº 133543/2017-0;
- CNPq Proc. nº 309854/2017-2.
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil – CAPES – Código de Financiamento 001.
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP – USP)
- Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – FFCLRP/USP
- Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FAEPA – HCFMRP – USP)

Nome: VIEIRA, Johnathan de Andrade

Título: Estresse oxidativo e alterações nos perfis de expressão gênica em idosos com comprometimento cognitivo leve

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

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Julgamento _____

Dedico especialmente aos meus pais, Donizete Vieira e Arilma Vitória, meus maiores exemplos. Obrigado por cada incentivo, apoio, cuidado, orientação e pela preocupação para que essa jornada fosse concluída.

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dr.^a **Elza Tiemi Sakamoto-Hojo** pela orientação deste trabalho, que acreditou em mim, que ouviu pacientemente as minhas considerações e compartilhou comigo as suas ideias, conhecimento e experiências. Quero expressar o meu reconhecimento e admiração por sua competência profissional, por ser uma profissional extremamente qualificada e pela forma que conduziu minha orientação.

À Prof.^a Dr.^a **Catarina Satie Takahashi**, pela compreensão, apoio, incentivos constantes e principalmente pelo carinho e companheirismo nos momentos em que a tarefa parecia grande, pesada demais, quase impossível, pude compartilhar de minhas angústias, inquietações, ansiedades e assim amenizá-las para o melhor rendimento e desenvolvimento da dissertação.

Ao prof. Dr. **Aguinaldo Luiz Simões**, chefe do departamento de Genética, por conduzir com excelência as atividades de chefia do departamento.

À prof. Prof.^a Dr.^a **Ester Silveira Ramos**, coordenadora do programa de pós-graduação, pela coordenação da pós-graduação e por estar sempre atenta às necessidades dos alunos.

Ao Prof. Dr. **Júlio C. Moriguti**, por colaborar e permitir a coleta das amostras dos pacientes e pelos ensinamentos, exemplo de profissionalismo e dedicação.

À Dr.^a **Rívia Siqueira Amorim**, pelo apoio e colaboração no projeto, sem dúvidas é a pessoa mais determinada que conheço, se tornou uma amiga muito especial.

Aos laboratórios que contribuíram, diretamente ou indiretamente, em especial, ao **Laboratório de Imunogenética Molecular, Laboratório de Pesquisas Forenses e Genômicas e Laboratório de Genética e Biologia Molecular de Fungos**. Em especial aos alunos **Max Jordan Duarte** e **Tamires Bitencourt**.

A todos os médicos do **GEDEM (Geriatría das Demências)** do **HC/FMRP-USP** e aos residentes pela paciência e cordialidade. Bem como a todas as pessoas que doaram sangue para o meu trabalho, pelo esforço e compreensão, sem os quais esta pesquisa não teria sido realizada.

À Sra. **Susie A. Nalon** e ao Sr. **Gustavo Medeiros**, pela disponibilidade e eficiência nas atividades junto à secretaria da pós-graduação.

À **Maria Oliveira (D. Maria)** por todo carinho e amor compartilhado e que cuida com muito zelo da limpeza do laboratório, um belo exemplo de comprometimento, carisma e simpatia, carinho especial.

Aos colegas do laboratório: **Thayná Flores, Ana Beatriz, Larissa Piassi**, pela paciência e força e aos professores que desempenharam com dedicação as aulas ministradas. Em especial a **Laís Bianchoni, Danilo Xavier, Ana Paula Montaldi, Jéssica Ellen e Natália Chermont** pela ajuda nos experimentos realizados e, por fim, ao **Luiz Augusto da Costa Júnior (Junão)** pelo suporte técnico. Além das boas conversas, conselhos e risadas.

Aos meus amigos **Diego Brito, Eduardo Rosa, Larissa Vieira, Ernna Hérída, Mércia Ferreira, Reginaldo Passos, Neuza Braga e Vitória Chaves** pelo companheirismo, dignidade, carinho, autenticidade e amizade, que sempre esteve ao meu lado nos momentos engraçados, tristes, alegres e na cumplicidade do dia-a-dia. Minha **Avó Maura**, pelo amor e conselhos e a **Ana Carla** por todo incentivo e amor compartilhado, além dos sorrisos mais sinceros.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e paciência em analisar este trabalho, enriquecendo-o com críticas e sugestões.

Agradeço, por fim, ao **Programa de Pós-Graduação em Genética** da Universidade de São Paulo pela realização do mestrado.

El poema más bello de Alzheimer

No me pidas que recuerde,
no trates de hacerme comprender,
déjame descansar.

Hazme saber que estás conmigo,
abrazá mi cuello y toma mi mano.

Estoy triste, enfermo y perdido,
todo lo que sé,
es que te necesito.

No pierdas la paciencia conmigo,
no me juzgues, no me grites y no llores por favor.
No puedo hacer nada con lo que me ocurre,
aún si trato de ser diferente, no lo logro.

Recuerda que te necesito.

Que lo mejor de mí, ya partió y no regresará jamás.
No me abandones, quédate a mi lado, como yo siempre estuve contigo
cuando fuiste niño.

Ámame y cuidame, hasta mi último aliento de vida.
Que en la distancia, siempre seré tu ángel guardián, porque te amo y
siempre serás el ser más importante en mi vida.

Anónimo

RESUMO

VIEIRA, J. A. **Estresse oxidativo e alterações nos perfis de expressão gênica em idosos com comprometimento cognitivo leve**. 2019. 80f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

O envelhecimento é marcado pelo declínio funcional e cognitivo com maior suscetibilidade a doenças relacionadas à idade, sendo a idade um dos principais fatores de risco para doenças neurodegenerativas. O decaimento da cognição normal associado à idade, sem o declínio funcional, é caracterizado como Comprometimento Cognitivo Leve (CCL). No funcionamento normal do metabolismo, há o equilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a defesa antioxidante, mas quando há o desequilíbrio entre a geração de ROS e a ineficácia dos mecanismos celulares de defesa antioxidante ocorre o estresse oxidativo, culminando em instabilidade genômica. A hipótese do presente trabalho é que os pacientes com CCL e os indivíduos saudáveis (N-CCL) apresentam níveis diferentes de dano oxidativo no DNA, alterações em genes associados à progressão do ciclo celular e reparo do DNA, além de alterações ao nível de mitocôndrias. Sendo assim, o presente estudo consistiu em analisar as alterações celulares e moleculares em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com CCL comparados ao grupo N-CCL. A análise dos níveis de danos no DNA (ensaio cometa com OGG1) em células mononucleares, realizada para os grupos N-CCL (n = 17) e CCL (n = 9), indicaram um nível elevado de dano oxidativo (8-oxodG), estatisticamente significativo ($p < 0,01$) em CCL comparado ao N-CCL, mas não houve diferença significativa entre os grupos estudados para os resultados quanto ao dano basal no DNA (ensaio cometa convencional). Para alguns indivíduos de ambos os grupos, N-CCL (n = 7) e CCL (n = 6), foi analisada a expressão de genes com funções associadas ao estresse oxidativo, progressão do ciclo celular e dano ao DNA. Os níveis de expressão transcricional dos genes *ATM*, *ATR* e *MTH1* não foram alterados; apenas o gene *CDKN1A* apresentou expressão significativamente aumentada em CCL em relação ao grupo N-CCL. A análise de expressão proteica para SOD1 e TP53, realizada por *Western Blot*, mostrou que somente a TP53 apresentou um aumento significativo ($p < 0,05$) de aproximadamente 1,9 vezes nos indivíduos CCL, comparativamente ao grupo N-CCL. Por meio de citometria de fluxo utilizando corantes fluorescentes, foram

avaliadas alterações nos níveis de ROS intracelular e em parâmetros mitocondriais (massa, potencial de membrana, níveis de ROS), sendo observadas alterações significativas apenas na massa mitocondrial ($p < 0,05$) em pacientes com CCL comparados aos N-CCL, não havendo diferenças entre os grupos quanto aos demais parâmetros. Em conjunto, os resultados indicaram níveis aumentados de dano oxidativo ao DNA, alteração na massa mitocondrial e maior expressão do gene *CDKN1A* nos pacientes com CCL. Ainda que com um número de amostras limitado, os resultados mostraram que lesões oxidativas, alterações na expressão de TP53 e na massa mitocondrial dos pacientes CCL possam representar características relevantes nos estágios iniciais da demência, mas ainda, sem manifestações fenotípicas de maior gravidade.

Palavras-chave: comprometimento cognitivo leve, estresse oxidativo, ciclo celular, dano e reparo do DNA, alterações mitocondriais, envelhecimento.

ABSTRACT

VIEIRA, J. A. **Oxidative stress and alterations in gene expression profiles in elderly with mild cognitive impairment.** 2019. 80f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Aging process is marked by functional and cognitive decline with increased susceptibility to age-related diseases, and age itself seems to be a main risk factor for neurodegenerative diseases. The age-related decay of normal cognition is characterized as Mild Cognitive Impairment (MCI). In the normal functioning of the metabolism, there is a balance between the production of reactive oxygen species (ROS) and antioxidant defense, but when there is an imbalance between the increase of ROS and the inefficacy of the cellular mechanisms of antioxidant defense, oxidative stress occurs, culminating in genomic instability. The hypothesis of the present work is that patients with MCI and healthy individuals (N-MCI) present different levels of DNA oxidative damage, changes in the expression of genes associated with cell cycle progression and DNA repair, as well as changes in mitochondria. The present study consisted of analyzing cellular and molecular alterations in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of MCI patients compared to the N-MCI group. Analysis of DNA damage levels (hOGG1 assay) was performed in PBMC of N-MCI (n = 17) and MCI (n = 9) groups of patients; the results indicated a higher level of oxidative damage (8-oxo-dG) ($p < 0.01$) in MCI compared to N-MCI, but there was no significant difference between the two groups regarding DNA damage levels (conventional comet assay). For few individuals from both groups, N-MCI (n = 7) and MCI (n = 6), transcript and protein expression were evaluated for genes associated with oxidative stress, cell cycle progression and DNA damage. The levels of transcript expression of *ATM*, *ATR* and *MTH1* genes were not changed, but only the *CDKN1A* gene showed a significant increase in the expression level in MCI compared to the N-MCI group. The expression of SOD1 and TP53 proteins, analyzed by Western blot, showed that only TP53 presented a significant increase ($p < 0.05$) of approximately 1.9 times more in MCI, compared to N-MCI patients. By using flow cytometry with fluorescent dyes, we analyzed intracellular ROS and mitochondrial parameters (mass, membrane potential, ROS levels) in PBMCs; significant changes were observed only for mitochondrial mass

($p < 0.05$) when MCI patients were compared to the N-MCI group. Therefore, the results indicated increased levels of oxidative DNA damage, altered mitochondrial mass and increased *CDKN1A* gene expression in MCI patients. Although with a limited number of samples, the present results showed that oxidative damage, alterations in TP53 expression and mitochondrial mass of MCI patients may represent relevant characteristics in the early stages of dementia, but still without perceptible phenotypic manifestations.

Keywords: mild cognitive impairment, oxidative stress, cell cycle, DNA damage and repair, mitochondrial alterations, aging.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática dos mecanismos de reparo da 8-oxodG pelas enzimas OGG1, MUTYH (MYH) e MTH1	26
Figura 2 - Configuração do <i>gate</i> para análise dos parâmetros mitocondriais no <i>CytoSoft</i> 4.2.1 <i>Guava</i>	39
Figura 3 - Danos no DNA avaliados pelo ensaio cometa	47
Figura 4 - Amplificação do gene endógeno <i>B2M</i> em gel de agarose.	48
Figura 5 – Curvas de amplificação gênica por RT-qPCR	49
Figura 6 - Expressão gênica relativa dos genes avaliados por RT-qPCR em PBMC de pacientes N-CCL e CCL	50
Figura 7 – Resultado da análise de parâmetros mitocondriais em PBMC de pacientes N-CCL e CCL, avaliadas em termos de intensidade de fluorescência média.....	52
Figura 8 – Expressão relativa de SOD1 (~18kDa) em indivíduos N-CCL e CCL, normalizada por meio da expressão da proteína endógena β -actina	53
Figura 9 - Análise de expressão proteica	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência dos <i>Primers</i> utilizados para a análise da expressão gênica transcricional pelo método de PCR quantitativa em tempo real.	36
Tabela 2 - Caracterização de pacientes N-CCL, incluindo código de amostra, sexo (M: masculino; F: feminino), idade, etnia, escolaridade e patologia. *: Quantidade de anos frequentados na escola. P. A.: Peso Adequado; H.A.S.: Hipertensão Arterial Sistêmica; MAN.: Mini Avaliação Nutricional.	44
Tabela 3 - Caracterização de pacientes CCL, incluindo código de amostra, sexo (M: masculino; F: feminino), idade, etnia, escolaridade e patologia. *: Número de anos frequentados na escola. P. A.: Peso Adequado; H.A.S.: Hipertensão Arterial Sistêmica; MAN.: Mini Avaliação Nutricional.	45
Tabela 4 - Valores das médias $\pm$ desvio padrão das porcentagens de DNA na cauda.....	46
Tabela 5 – Expressão relativa de genes avaliados por RT-qPCR em PBMC de idosos N-CCL e CCL. Valores representados como média $\pm$ desvio padrão. *p= 0,01 indica diferença estatisticamente significativa quando comparado os grupos.....	49
Tabela 6 – Valores médios obtidos para os parâmetros mitocondriais em idosos N-CCL e CCL. Valores representados como média $\pm$ desvio padrão;.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS

8-oxodG	8-hidroxi-2'-desoxiguanosina
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
ATR	Ataxia Telangiectasia and Rad3 Related
Ca	Cálcio
CCL	Comprometimento Cognitivo Leve
cDNA	DNA complementar
DA	Doença de Alzheimer
dG	Deoxiguanosina
DHE	Dihydroethidium
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DSB	<i>Double Strand Break</i> – quebra de dupla fita
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
HCRP	Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> - Vírus da Imunodeficiência Humana
hOGG1	<i>8-oxoguanine DNA glycosylase human</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFM	Intensidade de Fluorescência Média
IMC	Índice de Massa Corporal
K	Potássio
MAN	Mini Avaliação Nutricional
MTH1	<i>Human MutT Homolog 1</i>
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
Na	Sódio
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclears Cells</i> – Células Mononucleares do Sangue Periférico
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
qRT-PCR	PCR quantitativo em tempo real
RIN	<i>RNA integrity number</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> - Espécies Reativas de Oxigênio
SOD1	Superóxido Dismutase
TMRM	<i>Tetramethylrhodamine methyl ester</i>
TP53	<i>Tumor protein 53</i> – Proteína de tumor TP53
TSH	Hormônio Estimulante da Tireoide
USP	Universidade de São Paulo
UA	Unidade Arbitrária
VDRL	<i>Veneral Disease Research Laboratory</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 Envelhecimento e declínio cognitivo	19
1.2 Comprometimento Cognitivo Leve.....	20
1.3 Declínio cognitivo e doença de Alzheimer.....	22
1.4 Danos no DNA, estresse oxidativo e disfunção mitocondrial	23
2. OBJETIVOS	29
2.1. Objetivo geral.....	29
2.2. Objetivos específicos	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1 Grupos de pacientes e controles.....	31
3.2 Avaliação Nutricional	32
3.3 Coleta de Sangue e Separação de Células Mononucleares do Sangue Periférico	33
3.4 Avaliação da expressão gênica transcricional por PCR quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR)	33
3.5 O ensaio cometa alcalino	36
3.6 Avaliação das alterações Mitocondriais	38
3.7 Análise estatística.....	42
4. RESULTADOS	44
4.1 Grupo de amostras	44
4.2 Danos no DNA.....	46
4.3 Expressão gênica transcricional	48
4.4 Alterações mitocondriais	51
4.5 Expressão de SOD1 e TP53	53
5. DISCUSSÃO	56
6. CONCLUSÕES	64
7. REFERÊNCIAS	66
8. ANEXOS	76

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Envelhecimento e declínio cognitivo

Nas últimas décadas tem sido observado um evidente aumento na expectativa de vida da população humana, gerando um grande impacto sob o ponto de vista socioeconômico. No Brasil, os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) mostram que em 2018, a média de expectativa de vida da população brasileira é 76 anos, sendo 72,5 para a população masculina e 79,6 anos para a feminina. Para este ano (2019), a projeção calculada para indivíduos com idade superior a 65 anos, é de aproximadamente 19,2 milhões de idosos no Brasil, representando 9,2% da população brasileira (IBGE, 2019).

O processo de envelhecimento pode ser entendido como resultado da involução progressiva dos sistemas fisiológicos com o decorrer do tempo, levando a uma deterioração de capacidades e de aptidões, tanto físicas quanto cognitivas (KNIGHT, 2017). Com a deterioração progressiva dos sistemas fisiológicos, considera-se normal que haja um declínio cognitivo devido à maior dificuldade em processar e armazenar novas informações com o avanço da idade, especialmente em pessoas com idade superior a 65 anos (TRICCO, 2012; ESHKOOR, 2014). Portanto, é importante diferenciar os diversos graus de magnitude do comprometimento cognitivo normal relacionado à idade, com as condições mais acentuadas, tais como o comprometimento cognitivo leve (CCL) e demência (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

A demência é caracterizada clinicamente quando há a deterioração do desempenho cognitivo no qual o indivíduo não consegue manter uma função diária independente (IOM, 2015), diferentemente do comprometimento cognitivo relacionado à idade, no qual corresponde a mudanças na memória e cognição, que são vistas com o avanço da idade, mas de tal forma que não afete a independência diária (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013; SACHDEV ET AL, 2014). Com o passar do tempo, ocorre gradativamente um aumento de instabilidade genômica (BURHANS E WEINBERGER, 2007), sendo a idade o principal fator de risco para neurodegeneração, declínio cognitivo e doenças cardiovasculares (LÓPEZ-OTÍN et

al., 2013; KENNEDY, 2014). As habilidades relacionadas ao raciocínio conceitual, memória, pensamento abstrato e resposta de processamento vão diminuindo gradativamente, devido à maior dificuldade para processar e armazenar novas informações (WISDOM, 2012; KANE, et al., 2017).

O processo de declínio cognitivo devido ao envelhecimento tem sido principalmente relacionado a vias ligadas ao estresse oxidativo, havendo evidência de que genes-chaves possam estar implicados na longevidade humana, no declínio da eficiência de reparo do DNA, na disfunção mitocondrial e também no encurtamento dos telômeros (LÓPEZ-ÓTIN ET AL., 2013; DEBRABANT ET AL., 2014; SILVA, 2015). Entretanto, ainda, esse tema constitui um grande desafio para a ciência, requerendo pesquisas no âmbito multidisciplinar, sendo crucial a fundamentação científica em termos de abordagem genética, as quais possam identificar as alterações responsáveis pela transição de um estado considerado normal para uma condição patológica.

1.2 Comprometimento Cognitivo Leve

O CCL, clinicamente, se refere ao comprometimento cognitivo em grau acima do que é esperado para o comprometimento cognitivo normal relacionado à idade. Os pacientes com CCL podem apresentar deficiências mensuráveis em qualquer um dos domínios cognitivos, ou seja, a aprendizagem e memória, interação social, linguagem, visão espacial, pensamento abstrato ou execuções de tarefas diárias. No entanto, os pacientes com CCL não possuem comprometimento em suas atividades diárias (GAUTHIER ET AL., 2006; AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013). No Brasil, a taxa de prevalência de indivíduos com CCL foi de 6.1%, com incidência de 13.2/1000 pessoas/ano com idade igual ou superior a 60 anos (BRUCKI, 2013).

Outro fator de risco para o declínio cognitivo é a desnutrição (TANIGUCHI, 2014). Neste estudo, a frequência de desnutrição foi significativamente maior no grupo de idosos com idade acima de 64,5 anos e com CCL, quando comparada ao grupo de idosos com cognição normal. Além disso, a análise revelou que as associações entre CCL e deficiência nutricional permaneceram significativas após o ajuste para idade, analfabetismo e depressão (OGAWA, 2014). Uma possível correlação também foi

encontrada entre deficiência em nutrientes específicos, como a vitamina B12 e o folato, e diminuição da função cognitiva (MOORE, 2012; MICHELAKOS, 2013). Esses resultados sugerem que o CCL possa estar associado à desnutrição, o que enfatiza a importância da identificação precoce do estado nutricional desses idosos.

Embora o CCL seja uma condição de maior risco à progressão para a demência, em alguns casos, pode ocorrer um retorno à cognição normal, ou permanecer estável sem haver progressão para o estágio de demência (WARD, 2012; ODAWARA, 2014; ALZHEIMER ASSOCIATION, 2017). Neste contexto, é fundamental a identificação de indivíduos com CCL durante a fase de pré-demência, principalmente aqueles com problemas de memória, que são mais propensos a desenvolverem a Doença de Alzheimer (DA) ou outras demências, comparados aos que apresentam cognição normal. Por outro lado, nem sempre o declínio cognitivo culminará em demência (GAUTHER, 2006; WARD, 2012; SACHDEV ET AL, 2014).

O diagnóstico clínico para CCL é realizado por um médico especializado com base nos sintomas do paciente, nos dados de avaliação da função de independência e atividades diárias, avaliação de humor, exame neurológico no consultório, informação de um cuidador próximo e avaliação do estado mental.

Caso haja dificuldade em confirmar o diagnóstico de CCL ou alterações cognitivas, são necessários outros exames para avaliação de imagens cerebrais (tomografias e/ou ressonância magnética nuclear) e outras análises complementares realizadas em sangue, tais como: hemograma completo, dosagem de sódio, potássio, cálcio, ureia, creatinina, glicemia de jejum, enzimas hepáticas (aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase), hormônio tireoestimulante (TSH), vitamina B12, folato e sorologias para sífilis (VDRL – *Venereal Disease Research Laboratory*) e HIV (vírus da imunodeficiência humana) (ALZHEIMER ASSOCIATION, 2017).

Esses métodos, no entanto, podem mascarar a variabilidade de desempenho entre indivíduos que não conseguem concluir a tarefa e mostram um alto número de falsos positivos. De fato, considera-se que o CCL possa ser clinicamente detectado numa fase precoce, antes do desenvolvimento da DA, representando o desvio do declínio cognitivo inicial em relação ao envelhecimento normal, sendo interessante o fato de que nem todos os casos de CCL evoluem para DA, ressaltando a importância de estudos para tentar determinar o limiar entre essas condições (CLEMENTE, 2008).

Por essa razão, é muito importante examinar essas mudanças em nível molecular e elucidá-las precocemente por meio de biomarcadores moleculares (CUMMINGS, 2010).

Ainda não há nenhum tipo de tratamento farmacológico aprovado para o CCL; entretanto, a progressão pode ser retardada ou interrompida com exercícios mentais, mudanças no estilo de vida e estado nutricional, os quais podem reverter os sintomas do CCL (SANFORD, 2017; ALZHEIMER ASSOCIATION, 2017).

1.3 Declínio cognitivo e doença de Alzheimer

A DA é uma doença crônica e complexa, na qual ocorre destruição progressiva e irreversível de neurônios, gerando a desregulação de múltiplas vias biológicas, decorrentes de alterações moleculares, genéticas, epigenéticas, neurofisiológicas, cognitivas e comportamentais (AVRAMOPOULOS, 2009; ZHAO E BHATTACHARJEE et al., 2015). Em 2018, 50 milhões de pessoas no mundo foram identificadas com a DA e estima-se que esse número triplicará para aproximadamente 150 milhões de indivíduos até 2050 (ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL, 2018). Além da perda neuronal, outras alterações também têm sido associadas à DA, tais como a perda de massa branca, disfunção mitocondrial, deposição de beta amiloide ($A\beta$) e processos inflamatórios (HIRAI e ALIEV et al. 2001; ISAACS e SENN et al. 2006).

Os marcadores neuropatológicos mais frequentes observados em DA são: a) a agregação de peptídeos $A\beta$ (peptídeos $A\beta$) em oligômeros, uma estrutura compacta fora dos neurônios; b) emaranhados neurofibrilares (NFT – *neurofibrillary tangles*), os quais são agregados de proteína tau hiperfosforilada, com localização intracelular; c) processo inflamatório; d) danos na substância branca. O peptídeo $A\beta$ é derivado do processamento proteolítico anormal da proteína precursora amiloide (APP) por enzimas de processamento (β - e γ -secretases). Essas proteínas alteradas são depositadas como placas extracelulares chamadas placas de beta amiloide (GORLOVOY, 2009). A atrofia da massa cinzenta retrata a progressão da patologia, constituindo um marcador precoce eficaz *in vivo* da DA, mesmo que as mudanças

estruturais no lobo temporal medial sejam generalizadas em estágio precoce da doença (MCEVOY, 2009).

As características histológicas dos pacientes com DA, em nível histopatológico, são detectadas quando os pacientes apresentam neurodegeneração e perda de sinapses, que são alterações relacionadas à memória e funções cognitivas (SINGH, SRIVASTAV et al., 2016), sendo o envelhecimento o principal fator de risco (BLENNOW, LEON et al., 2006). A etiologia da DA em nível celular e molecular ainda não é compreendida, mas a disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo podem desempenhar papéis cruciais no desenvolvimento da doença (MOREIRA E CARVALHO, 2010; BHAT, 2015; LIU, 2017). Anormalidades mitocondriais, tais como o aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *Reactive oxygen species*) e deficiência de defesa antioxidante são eventos chave nessa patologia (GARCÍA-ESCUDERO, 2013; LIU, 2017).

As alterações fisiopatológicas que causam o comprometimento cognitivo, funcional e comportamental em DA se iniciam vários anos ou talvez décadas antes mesmo do início dos sintomas clínicos reconhecíveis (VILLEMAGNE, 2015). Contudo, a identificação da DA no período pré-clínico é realizada por exclusão de outras demências (MCKHANN E DRACHMAN et al., 1984; FRED, 2013). Nesse período pré-clínico, existe a oportunidade para intervenções clínicas com o propósito de retardar a progressão das alterações patológicas, tais como o comprometimento cognitivo e a demência. Nas condições atuais, o diagnóstico definitivo da DA só pode ser realizado quando há confirmação histopatológica de uma biópsia ou autópsia, embora os avanços ocorridos nos exames de imagem neuroestrutural por ressonância magnética tornem possível o diagnóstico *ante-mortem* (SPERLING, 2014; TOSUM, 2017),

1.4 Danos no DNA, estresse oxidativo e disfunção mitocondrial

No funcionamento normal do metabolismo, o equilíbrio entre a produção de ROS e a defesa antioxidante é mediado por enzimas antioxidantes, tais como a superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase e catalase, entre outras, além de pequenas moléculas com função antioxidantes, como as vitaminas. Porém, há dados consistentes na literatura que demonstram que a falta de equilíbrio entre a geração de

ROS e a ineficácia dos mecanismos celulares de defesa antioxidante resultam em estresse oxidativo, culminando em instabilidade genômica (SAHA et al., 2005; KONG, 2014).

Em sangue periférico, tem sido relatado que o estresse oxidativo ocasiona aumento significativo de danos no genoma do DNA mitocondrial (DNAm_t) (LOVELL, 2007), peroxidação lipídica (IYAMA E WILSON, 2013; BOLISETTY E JAIMES, 2013), deficiência dos mecanismos de reparo do DNA em pacientes com DA (Leandro, et al, 2013; YU et al., 2018), redução da síntese de ATP e distúrbios mitocondriais (OCHOA et al., 2011).

As ROS constituem um grupo de moléculas geradas como subprodutos do metabolismo celular, derivadas do oxigênio e provenientes principalmente da respiração aeróbica. São agentes endógenos que mais causam danos endógenos à molécula de DNA e em nucleotídeos livres, podendo ser derivadas de radicais livres, como os radicais hidroxil e superóxido, ou de moléculas que não são radicais livres, como o peróxido de hidrogênio (BOLISETTY E JAMES, 2013).

Os radicais livres são moléculas ou fragmentos de moléculas que possuem um elétron não pareado que os tornam instáveis, reativos e altamente transitórios, com potencial para reagir com outra molécula. Para estabilizar o radical livre ocorre a captura de um elétron de uma molécula que conseqüentemente irá causar alterações estruturais, além de oxidação específica de bases ou quebras nas cadeias do DNA.

Em condições normais, 2 a 5% do oxigênio consumido pelas mitocôndrias são convertidos em ROS (ZWART al., 1999; Kim et al. 2015); além disso, existe também a produção de ROS por fontes exógenas, como compostos químicos, radiações ionizantes e luz ultravioleta (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1988; IYAMA e WILSON, 2013). Embora várias bases no DNA possam ser oxidadas pelas ROS, a 7,8-di-hidro-8-oxo-desoxiguanosina (8-oxo-dG) tem sido a principal lesão estudada, além de ser um biomarcador amplamente empregado na análise de danos no DNA nuclear e mitocondrial (SHAO et al., 2008).

A deoxiguanosina (dG) sofre alteração para 8-oxo-dG quando o DNA é alvejado por ROS no oitavo carbono. Embora as outras bases (adenina, citosina e timina) do DNA possam reagir com os íons hidroxila de modo semelhante, a guanina é a mais facilmente oxidada devido ao potencial de oxidação relativamente maior. Portanto, a lesão 8-oxo-dG é o biomarcador mais abundante e promutagênico e,

portanto, um importante marcador para danos no DNA causados pelo estresse oxidativo.

As principais enzimas responsáveis pelo reparo da guanina oxidada são: OGG1 (*8-oxoguanine DNA glycosylase*), MTH1 (MutT homolog-1) e MUTYH (MutY homolog). As ROS geram a 8-oxodG no DNA e 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine-5'-triphosphate (8-OH-dGTP) em nucleotídeos livres. As lesões podem ser removidas pela enzima OGG1, a qual restaura o pareamento correto G:C. Caso não haja reparo por excisão de base (BER), será gerado um erro de pareamento durante a síntese de DNA resultando no pareamento incorreto G:A. A Adenina pareada à guanina oxidada pode ser removida pela enzima MUTYH, sendo que na etapa seguinte, poderá incorporar a base correta. Se a Adenina não for removida, irá parear-se com T na próxima duplicação do DNA, levando à transversão C:G para T:A. Já a enzima MTH1 hidrolisa nucleotídeos livres 8-OH-dGTP para formar monofosfatos, pois quando um 8-OH-dGTP é erroneamente incorporado à fita oposta a A pela DNA polimerase, a guanina oxidada irá provocar inserção de C na próxima duplicação do DNA, gerando transversões T:A para G:C (**Figura 1**) (BRUNER et al., 2000; NOHMI et al., 2005).

Por ser uma das primeiras enzimas a atuar no reparo do DNA, a OGG1 é considerada uma enzima fundamental no sistema celular de prevenção de danos oxidativos, sendo que um aumento na expressão da mesma pode ser um indicador indireto da resposta celular ao aumento da oxidação da guanina (NOHMI et al., 2005).

Conforme mencionado anteriormente, os danos estruturais ao longo do tempo culminarão em processo de estresse oxidativo, o que contribui para o envelhecimento e declínio cognitivo, o qual é observado em uma variedade de doenças degenerativas (MILLER, BUETTNER et al., 1990; LOBO et al., 2010).

Figura 1 - Representação esquemática dos mecanismos de reparo da 8-oxodG pelas enzimas OGG1, MUTYH (MYH) e MTH1

C: Citosina, G: Guanina, A: Adenina, T: Timina, GO: Guanina Oxidada.

Fonte: Adaptado de NOHMI et al. (2005).

Algumas alterações neuropatológicas são observadas, tanto em pacientes com CCL quanto em DA, como as placas neuríticas nas regiões neocorticais e os emaranhados neurofibrilares no lobo temporal (MARKESBERRY, 2006). Os pacientes com DA possuem o mesmo comprometimento da função mitocondrial que os indivíduos com CCL e estão sob maior estresse oxidativo em comparação com os sadios (RETZ et al., 1998), o que acarreta diminuição da atividade da enzima citocromo c oxidase (VALLA et al., 2006), diminuição do potencial de membrana mitocondrial e redução no conteúdo de citocromo c mitocondrial (SILVA et al, 2013).

Embora a natureza da patogênese seja complexa na DA, sabe-se que o estresse oxidativo desempenha um papel fundamental, mesmo nos estágios iniciais da doença (CHANG et al., 2014). Assim, embora haja evidência de que a disfunção

mitocondrial possa desempenhar um papel crítico no CCL e na sua progressão para DA, os mecanismos subjacentes ainda são pouco compreendidos.

A prevalência de pacientes que apresentam CCL tem aumentado em países desenvolvidos e em desenvolvimento, dado o envelhecimento demográfico rápido. Sob essas condições, torna-se prioritária a identificação de indivíduos com risco de desenvolver demência, visto que essa identificação precoce nos estágios iniciais da doença possibilita direcionar os pacientes para intervenções preventivas. O CCL é uma fase intermediária entre declínio cognitivo e demência, relacionadas ao envelhecimento normal, portanto, a identificação de indivíduos com CCL apresenta grande importância na intervenção precoce, prevenção e tratamentos adequados para os pacientes.

Os indivíduos com CCL constituem um grupo de alto risco para evolução demencial, havendo dados na literatura indicando que estes desenvolvem demência em 10% a 15% dos casos por ano, em comparação com a população geral, cuja taxa é em torno de 1% a 2% dos idosos (ODAWARA, 2012; PINTO e SUBRAMANYAM, 2009; RASHID et al, 2012). De fato, é indiscutível a necessidade de compreender as mudanças cognitivas que acompanham o envelhecimento, tanto em estado normal como patológico. Embora haja indivíduos que não demonstrem tais condições atribuídas ao CCL, estes podem sofrer alterações cognitivas sutis, porém, não perceptíveis, sendo que estas provavelmente podem se associar a alterações moleculares, as quais são detectáveis por métodos de análise molecular.

Portanto, a busca por alterações moleculares que possam ser detectadas nesses pacientes apresenta grande relevância, além de grande potencial para a compreensão do processo de envelhecimento e do início do estado patológico, o que poderá fornecer dados interessantes em termos de prevenção e diagnóstico.

A hipótese do presente trabalho é que os pacientes com CCL e os indivíduos saudáveis (N-CCL) apresentam níveis diferentes de dano oxidativo no DNA, alterações em genes associados à progressão do ciclo celular e reparo do DNA, além de alterações ao nível de mitocôndrias. Sendo assim, o presente estudo consistiu em analisar as alterações celulares e moleculares em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com CCL comparados ao grupo N-CCL.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Comparar marcadores de estresse oxidativo, alterações em genes associados à progressão do ciclo celular e reparo do DNA, bem como avaliar níveis de danos oxidativos no DNA e alterações mitocondriais, em PBMC de pacientes com CCL e idosos saudáveis (grupo controle: N-CCL).

2.2. Objetivos específicos

- I. Avaliar os níveis de danos basais no DNA, isto é, quebras simples e duplas.
- II. Mensurar os níveis de danos oxidativos a partir das quebras simples e duplas no DNA.
- III. Analisar os perfis de expressão transcricional de genes com funções associados ao estresse oxidativo, danos e reparo do DNA.
- IV. Avaliar a expressão das proteínas SOD1 e TP53 visando identificar possíveis diferenças nos níveis de expressão das mesmas em PBMC de N-CCL e CCL.
- V. Quantificar os níveis de ROS celular.
- VI. Analisar os parâmetros mitocondriais, como detecção e quantificação de ROS mitocondrial, alterações no potencial de membrana e massa mitocondrial.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Grupos de pacientes e controles

Foram coletadas amostras de dois grupos de pacientes e controles, compostos por idosos, com faixa etária entre 74 a 94 anos, de ambos os sexos. O primeiro grupo é composto por 11 pacientes diagnosticados com CCL, e o segundo grupo, 19 indivíduos controles (N-CCL). As amostras de voluntários dos dois grupos foram coletadas no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (HCRP) ou em domicílio, após aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa (Anexo A).

A abordagem para participação e coleta de material biológico foi realizada pelo pesquisador responsável de forma individual, abrangente, esclarecida e explicativa, sobre a importância da participação na pesquisa. Em geral, as entrevistas dos indivíduos ocorreram no momento do retorno das consultas no HCRP ou por meio de uma visita domiciliar agendada por telefone.

Os critérios de inclusão para o primeiro grupo foram: faixa etária entre 66 e 95 anos de idade, presença de um informante capaz de fornecer informações consistentes, ter se submetido a exame neurológico, exames complementares e avaliação neuropsicológica, apresentar diagnóstico clínico de CCL e possuir qualquer nível de escolaridade. Para o segundo grupo, os critérios de inclusão foram: faixa etária entre 66 a 95 anos de idade, sem queixas de memória e funcionalidade normal sob o ponto de vista cognitivo e qualquer nível de escolaridade.

Os critérios de exclusão para os dois grupos foram os seguintes: pacientes que apresentarem condições como: depressão (não tratada), uso de medicamentos controlados, doenças crônicas degenerativas e cardiopatias, uso de drogas psicotrópicas, portadores de doenças psiquiátricas, obesos e desnutridos. Foram também excluídos fumantes e etilistas.

Todos os indivíduos que concordaram em participar da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (Anexo B e C). Os voluntários do primeiro (CCL) e segundo grupo (N-CCL) foram avaliados no Ambulatório de Geriatria das Demências e submetidos ao Mini Exame do Estado Mental (MEEM) (FOLSTEIN, 1975), CAMCOG (*Cambridge Cognitive Examination*) (BOTTINO et al., 2001), Escala Clínica de Demência (*Clinical Dementia Rating* – CDR) e o teste do

relógio (Hughes et al., 1982), Atividade da vida diária (*Activities of Daily Living* – ADL) (KATZ, 1963), escala de Cornell Scale para classificar baseado nos sintomas da depressão (ALEXOPOULOS et al., 1988), Mini Avaliação Nutricional (NESTLÉ, 1998) e Questionário do Informante sobre o Declínio Cognitivo do Idoso (*Informant Questionnaire on Cognitive Decline in the Elderly* – IQCODE) (JORM, 1994).

Além das avaliações acima mencionadas, os pacientes realizaram uma série de exames de rotina, tais como: ressonância magnética nuclear (RMN), hemograma completo, dosagem de sódio, vitaminas B12 e B9, hormônio estimulante da tireoide (TSH), potássio, cálcio total e ionizado, provas de função renal e hepática, enzimas hepáticas, hormônios tireoidianos e sorologia para sífilis e HIV. Estas avaliações foram realizadas pela médica Dra. Rívia Siqueira Amorim (GEDEM), especialista e doutoranda da própria instituição (HC – FMRP), sob a supervisão do Prof. Dr. Júlio Cesar Moriguti. Todos os medicamentos usados pelos voluntários foram anotados para posterior interpretação dos dados, visto que estes podem interferir nos resultados.

3.2 Avaliação Nutricional

Os participantes da pesquisa pertencentes aos dois grupos foram triados no momento da coleta do material biológico, através da Mini Avaliação Nutricional (MAN), descrito no “Guia para completar a Mini Avaliação Nutricional”, desenvolvido *pela Nestlé® Nutrition Institute*, seguindo os parâmetros de referência adotados para classificar o estado nutricional.

O MAN é um instrumento de avaliação simples e de rápida aplicação, pelo qual é possível avaliar o estado nutricional dos idosos. Esse instrumento foi aplicado no presente estudo visando detectar a presença de desnutrição ou obesidade, além do risco de desenvolvê-la, de modo a excluir da pesquisa os indivíduos portadores dessas características. Adicionalmente, análise sanguínea de micronutrientes (Na, K e Ca) e vitaminas (vitamina B12 e B9), também foram avaliados, evitando possíveis interferências decorrentes de alterações metabólicas.

3.3 Coleta de Sangue e Separação de Células Mononucleares do Sangue Periférico

As amostras de sangue periférico dos pacientes (aproximadamente 20 mL do sangue periférico) foram coletadas em domicílio ou no HCRP, no período matutino, por punção venosa em tubos de *vacutainer* contendo EDTA (*Beckton & Dickinson, EUA*). Após a coleta, cada amostra foi mantida sob refrigeração até a etapa de isolamento das PBMC, a qual ocorreu, em média, 20 min após a mesma. Para o isolamento de PBMC, o sangue foi diluído com solução salina 0,9% (1:1), homogeneizado e transferido cuidadosamente para tubos de centrifuga contendo *Ficoll-Histopaque 1077* (*Sigma Chemical Co, EUA*), novamente homogeneizado e centrifugado a 2.000 x g durante 20 min. Todos esses procedimentos foram realizados no gelo. Após centrifugação, houve a formação do anel contendo as PBMC na interface plasma/Histopaque a qual foi retirada, homogeneizada em solução salina (0,9%) para lavagem, seguida de centrifugação (2.000 x g por 5 min). O sobrenadante foi descartado e o precipitado contendo as PBMC foi ressuspensionado novamente em 1 mL de solução salina. As PBMC isoladas foram utilizadas para o ensaio cometa, extração de RNA.

3.4 Avaliação da expressão gênica transcricional por PCR quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR)

3.4.1. Extração de RNA

O RNA total foi isolado a partir do método de extração com o reagente TRIzol (*Invitrogen*). Para isso, foram utilizados 2 mL do reagente para cada amostra, seguido de incubação por 5 min à temperatura ambiente. Após homogeneização foram posteriormente acrescentados 0,4 mL de salina DEPC e 0,4 mL de clorofórmio. Cada tubo foi manualmente agitado vigorosamente por 15 seg e incubados por 5 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g (4° C por 15 min), sendo a fase aquosa incolor superior transferida para um novo tubo, no qual foi adicionado 1 mL de álcool isopropílico para precipitação do RNA. As amostras foram incubadas a -

20° C *overnight*. Após esse período, as mesmas foram incubadas por 10 min à temperatura ambiente e centrifugadas por 12.000 x g (4° C por 10 min). O sobrenadante foi removido e o precipitado de RNA lavado em etanol (75 %). As amostras foram misturadas por vórtex e centrifugadas a 7.500 x g (4° C por 5 min). Por fim, o RNA foi eluído em água livre de RNase, quantificados e armazenados a -80° C.

Todas as amostras foram quantificadas e avaliadas quanto à pureza utilizando o espectrofotômetro *Nanovue Plus* (GE Life Sciences), em comprimentos de onda 230 nm, 260 nm e 280 nm; todas as amostras utilizadas apresentaram razão entre 1,8 e 2,1. Como padrão, utilizou-se a razão A260/A280 para indicar que as amostras estão livres de contaminação por proteínas e a razão 260/230 para indicar a ausência de contaminação por compostos orgânicos, tais como fenol.

A integridade do RNA foi avaliada pelo *kit* RNA 6000 Nano (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA), no aparelho *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent) seguindo as instruções do fabricante. O aparelho utilizado calcula o número de integridade do RNA (RIN – *RNA integrity number*) com escala de 0 a 10. As amostras utilizadas apresentaram valor de integridade acima de 7 segundo as recomendações do fabricante.

Foi realizado o processo de purificação das amostras de RNA por meio da utilização o *kit* *Deoxyribonuclease I Amplification Grade (Invitrogen)* para remoção de possíveis moléculas de DNA presentes nas amostras de RNA. O volume final obtido foi de 10 µL seguindo as seguintes proporções: 1 µL de *DNase I Ampgrade* 1U/µL (Invitrogen), 1 µg de RNA total e água livre de nucleasse para completar o volume. As amostras foram armazenadas à temperatura ambiente por 15 min, posteriormente foi adicionado 1 µL de EDTA (25 Mm) para inativação da DNase, sendo as amostras incubadas por 10 min a 65°C, finalizando a reação.

3.4.2 Transcrição reversa para obtenção do cDNA

Após a purificação do RNA, foram realizadas as reações de transcrição reversa para obtenção do cDNA, por meio do *kit* *SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, USA)*. Foram adicionados 0,5 µL de *oligo (Dt) primer* (0.5 µg/µL) aos RNAs provenientes da reação. Os RNAs foram incubados por 10 min a 70° C e

transferidos para o gelo, em seguida, foram acrescentados 4 μL *5X First-strand buffer*, 2 μL de *DTT* (0,1 M), 1 μL de *DNTP* (10 Mm) e 1 μL de *SuperScript III RT* (200 U/ μL) em cada amostra. As amostras foram então incubadas a 50 °C por 50 min, seguido de inativação da reação, incubando-se as amostras a 70 °C por 15 min. O produto da reação foi armazenado a -20 °C.

Para confirmar o êxito da transcrição reversa, foi realizada a PCR convencional utilizando o *Kit Taq DNA polymerase recombinant* (Invitrogen). O protocolo utilizado foi composto por 2,5 μL de 10X *PCR reaction buffer*, 1,0 μL de MgCl_2 (50 Mm), 0,5 μL de *DNTP* (10 Mm), 0,5 μL do *primer B2M*, 0,5 μL de *Taq DNA polymerase recombinant* (5U/ μL) e 1,0 μL do cDNA, por fim, o volume da reação foi completado para 25 μL com água livre de nucleases (*Ambion, Grand Island, NY, EUA*). Foi utilizado o seguinte programa: primeiro passo por 5 min a 95° C, 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 60 °C e 1 min a 72 °C e um passo final de 10 min a 72 °C. Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5 %, corado com *GelRed 40X* (*Invitrogen*). Após a corrida, os géis foram visualizados utilizando um transiluminador de luz ultravioleta.

3.4.3 Expressão gênica transcricional por RT-qPCR

A avaliação dos níveis de expressão gênica foi realizada por meio de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR), a partir da metodologia *Prime Time qPCR Assay*. Foi utilizado o *Kit SYBR Green PCR Master Mix* (*Applied Biosystems, Foster City, USA*) seguindo as especificações de quantidades sugeridas pelo fabricante. As reações foram feitas com volume final de 12,5 μL , composto por 6,25 μL de *SYBR Green PCR Master Mix*, 1 μL do *primer forward e reverse* (ambos com 10 Mm) de cada gene de interesse (**Tabela 1**), 3,25 μL de água livre diluídas e 1 μL de cDNA (80 ng/ μL).

As reações foram montadas em placas de 96 poços (*MicroAmp optical 96 Well Reaction Plate – Applied Biosystems, Foster City, USA*) no gelo e seladas com o *MicroAmp Optical Adhesive Covers* (*Applied Biosystems, Foster City, USA*). O aparelho utilizado para as reações foi *QuantStudio® 3* (*Applied Biosystems, Foster City, USA*) utilizando o programa *QuantStudio 3 Real-Time PCR System*, sendo o programa composto por: incubação (2 min a 50 °C), ativação da polimerase (10 min a

95 °C), seguido por 40 ciclos de desnaturação do cDNA (15 seg a 95 °C), anelamento dos *primers* (1 min a 60°C), finalizando com o resfriamento (10 min 4 °C).

Foram avaliados nas amostras a expressão de transcritos de genes associados ao reparo de DNA (*ATM*, *ATR*), progressão do ciclo celular (*CDKN1A*) e dano ao DNA (*MTH1*), além do gene endógeno *B2M* (usado como referência).

Tabela 1 - Sequência dos *Primers* utilizados para a análise da expressão gênica transcricional pelo método de PCR quantitativa em tempo real.

Gene	Iniciador	Sequência	Tamanho do Produto (pb)
<i>ATM</i> <i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>	<i>ATM – Forward</i> <i>ATM – Reverse</i>	5' – GACGTTACATGAGCCAGCAA – 3' 5' – CACATGCGATGGAAAATGAG – 3'	100
<i>Ataxia Telangiectasia and Rad3-related Protein</i>	<i>ATR – Forward</i> <i>ATR – Reverse</i>	5' – GTGAGTGGAAGCCATGAGG – 3' 5' – ACAAATGACAGGAGGGAGTTG – 3'	109
<i>MutT Human Homolog 1</i>	<i>MTH1 – Forward</i> <i>MTH1 – Reverse</i>	5' – CGTGGAGAGCGACGAAAT – 3' 5' – CTGAAGCAGGAGTGGAACCC – 3'	103
<i>Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 1A</i>	<i>CDKN1A – Forward</i> <i>CDKN1A – Reverse</i>	5' – CTTCTGTGGGCGGATTAG – 3' 5' – GACTCTCAGGGTCGAAAACG -3'	105
<i>Beta-2-microglobulin</i>	<i>B2M – Forward</i> <i>B2M – Reverse</i>	5' – AGGCTATCCAGCGTACTCCA -3' 5' – TCAATGTCGGATGGATGAAA -3'	112

3.5 O ensaio cometa alcalino

3.5.1 Ensaio convencional

O ensaio cometa foi realizado de acordo com o protocolo adaptado de Singh et al., 1998, para detecção de danos do DNA nas PBMC dos grupos CCL e N-CCL. Após a coleta do sangue e separação das PBMC, as células foram lavadas em solução de PBS 1X e o *pellet* foi ressuspensionado com 400 µL de PBS 1X. As PBMC (40 µL) foram

ressuspendidas em 400 µL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5 %) a 37 °C. Posteriormente 50 µL foram adicionados em cada lâminas previamente cobertas com agarose de ponto de fusão normal. Lamínulas foram utilizadas para uniformizar a distribuição do material na lâmina, as quais foram mantidas a 4 °C para polimerização da agarose por 5 min.

Após polimerização da agarose, a lamínula foi removida e as lâminas imersas na solução de lise (5 M NaCl, 100 Mm EDTA, 10 Mm Tris, pH 10,0; 1 % Triton-X 100; 10 % DMSO), protegida da luz e mantida à baixa temperatura (4 °C) por no mínimo 12 h e no máximo 48 h. Para cada amostra foram confeccionadas e analisadas seis lâminas em duplicata.

3.5.2 Ensaio cometa com utilização da enzima hOGG1

Foi empregado o ensaio modificado para a detecção de possíveis lesões oxidativas no DNA (purinas oxidadas). Para isso, logo após o período de lise celular, as lâminas foram incubadas com a enzima hOGG1, uma endonuclease específica, que é capaz de identificar a purina oxidada 8-OhdG na molécula de DNA. A enzima hOGG1 remove a purina oxidada, causando uma ruptura da fita de DNA, a qual pode ser detectada pelo ensaio cometa. Um total de seis lâminas foi preparado para cada amostra (2 lâminas não tratadas, 2 lâminas com tampão de enzima e outras 2 tratadas com a enzima hOGG1).

Após a lise, as lâminas foram lavadas e equilibradas em tampão enzimático (40 Mm HEPES, 100 Mm KCl, 0,5 Mm EDTA, 0,2 mg/mL BSA; pH 8, ajustado com NaOH). Cada lâmina foi então tratada com 50 µL de tampão de enzima hOGG1 (0,12 unidades por gel – *New England Bio Lab Inc., Ipswich, MA, EUA*) e incubadas em uma caixa úmida (*Hybrite Slide Stainer, Vysis*) a 37 °C por 20 min. Em seguida, as lâminas foram colocadas em uma cuba de eletroforese previamente preenchida com tampão de eletroforese fresco (1 Mm EDTA e 30 Mm NaOH, pH > 13), e mantidas na solução por 20 min para permitir o desenrolar do DNA. Em seguida, a eletroforese foi realizada a 4 °C por 20 min, submetida a uma corrente elétrica de 0,7 V/cm (25 V/300 mA). Após a eletroforese, as lâminas foram imersas em tampão de neutralização (solução Tris 0,4 M, pH 7,5) e as lâminas desidratadas e fixadas por imersão em etanol absoluto.

3.5.3. Análise das lâminas

Em ambos os ensaios, convencional e modificado, as lâminas foram coradas com 50 µL de SYBR Green (40X) e cobertas com lamínulas. A análise foi realizada em um microscópio de fluorescência (*HBO50 – Axiolab, Carl Zeiss*) equipado com filtros de barreira (515-560 nm e 590 nm). Os danos no DNA foram analisados pelo *software Comet Assay IV (Perceptive Inst., Bury St. Edmunds, Suffolk, UK)*, o qual fornece os valores das intensidades de DNA na cauda. Foram analisadas 50 células por lâmina, totalizando em 100 células analisadas por indivíduo, pois o experimento foi realizado em duplicata. O parâmetro escolhido para a quantificação dos danos foi *Tail intensity*, o qual corresponde valores de porcentagem de DNA na cauda.

3.6 Avaliação das alterações Mitocondriais

Com a aplicação do método de citometria de fluxo, foi possível realizar avaliações comparativas de PBMC para alguns parâmetros relacionados com a integridade mitocondrial, tais como: quantificação de superóxido mitocondrial, por meio do *Mitosox* (1,5 µM); detecção de alterações do potencial de membrana, com o uso de TMRM, Tetrametilrodamina metil éster percolorato, (40 nM) e quantificação da massa mitocondrial com a utilização do reagente *MitoTracker green FM* (50 nM), além da detecção de superóxido intracelular, a partir do reagente fluorescente DHE, *dihidroetídio*, (1,5 µM). A geração de superóxido celular é detectada pelo DHE, que exibe fluorescência azul em sua forma reduzida, entretanto, uma vez na presença de radicais livres ocorre sua oxidação resultando em etídio, um intercalante de DNA com coloração vermelha-fluorescente no núcleo da célula, a qual pode ser mensurada. Para a quantificação mitocondrial, foi utilizado o *MitoTracker Green* que é um marcador mitocondrial verde-fluorescente permeável utilizado para marcar mitocôndrias, localizando-as independentemente do seu potencial de membrana.

O potencial de membrana mitocondrial foi mensurado pelo reagente TMRM, um corante vermelho-alaranjado que se acumula nas mitocôndrias que apresentam

potencial de membrana normal, levando a um sinal forte. Quando há perda desse potencial, o acúmulo de TMRM cessa e o sinal torna-se reduzido ou desaparece.

Após separação das PBMC, estas foram ressuspensas em PBS 1X com glicose (concentração). Aliquotas das células foram separadas em microtubos para a adição de cada um dos corantes utilizados.

Em todos esses métodos, foi utilizado sangue periférico fresco para que os resultados fossem o mais próximo das condições do paciente. A população de PBMC (**Figura 2**) foi delimitada de acordo com as características de granulosidade e tamanho (*side scatter versus forward scatter*).

Figura 2 - Configuração do *gate* para análise dos parâmetros mitocondriais no *CytoSoft 4.2.1 Guava*

No lado direito, a cor vermelha corresponde à população de PMBC.

Fonte: elaborado pelo autor.

3.7 Análise de expressão proteica por *Western Blot*

3.7.1. Extração de proteínas

As proteínas foram extraídas através do método com o reagente TRIzol (*Invitrogen*). O conteúdo do tubo contendo PBMC foi homogeneizado e lavado por inversão com solução salina 0,9%, a qual foi adicionada até completar o volume de 10 ml no tubo. A amostra foi centrifugada por 5 minutos a 2.000x *g* à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi dissolvido com 2 ml de

TRIzol, ao qual foram adicionados 400 µl de salina DEPC e mais 400 µl de Clorofórmio, seguido de agitação com vigor para homogeneização.

As amostras foram incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente, sendo depois centrifugadas por 15 minutos a 12.000 x g a 4°C, resultando em três fases: superior – aquosa, contendo RNA; interfase, contendo DNA; e inferior – contendo proteínas e outros conteúdos celulares mais densos. A fase superior aquosa foi removida.

As amostras, foram adicionados 0,6 mL de etanol absoluto, homogeneizado por inversão e incubados à temperatura ambiente por 3 min. Posteriormente, as células foram centrifugadas por 5 min a 2.000 x g a 4°C a fim de sedimentar o DNA.

O sobrenadante contendo proteínas foi transferido para um novo tubo, ao qual foram adicionados 3 mL de isopropanol, seguido de incubação por 10 minutos à temperatura ambiente.

As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12.000 x g a 4°C para que as proteínas se sedimentassem. O sobrenadante foi descartado e as proteínas foram lavadas e homogeneizadas rigorosamente com cloridrato de guanidina 0,3 M em etanol a 95%. As proteínas foram incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente e depois centrifugadas por 5 minutos a 7.500 x g a 4°C. O sobrenadante foi descartado e a lavagem foi repetida por mais duas vezes. Posteriormente, 2 mL de etanol absoluto foram adicionados às amostras, homogeneizados em vórtex e incubadas por 20 min à temperatura ambiente.

Após serem centrifugadas por 5 minutos a 7.500 x g a 4°C, o sobrenadante foi descartado e as proteínas precipitadas secadas ao ar por cerca de 10 min. Para solubilização das proteínas, foram utilizados 100 µL de uma solução de dodecilsulfato de sódio (SDS) a 1%, seguidos de homogeneização com vigor por pipetagem. Para facilitar a solubilização, as amostras foram sonicadas por 30 min incubadas por 5 minutos em banho-maria à 50°C.

Posterior a essa etapa, elas foram centrifugadas durante 10 min a 10.000 x g a 4°C para remoção de materiais insolúveis. Então, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e as amostras foram armazenadas em freezer a -20° C.

As proteínas foram quantificadas em um espectrofotômetro, pela comparação com uma curva-padrão obtida para uma proteína conhecida (albumina bovina), com uso do Kit BSA (*Thermo Fisher Scientific, Inc*).

3.7.2 Western Blot

A técnica de *Western Blot* foi utilizada para avaliação da expressão da superóxido dismutase 1 (SOD1) e da proteína supressora de tumor (TP53). Foram utilizados géis de Bis-Tris com dimensões 8 x 8 x 0,1 cm (*Invitrogen*) para análise do perfil das proteínas. As amostras, previamente congeladas a -20°C e descongeladas em gelo. Foram preparadas 20 µg de proteínas, tampão NUPAGE *Sample Buffer* (*Invitrogen*) e agente redutor NUPAGE (*Invitrogen*). As proteínas foram desnaturadas a 100°C por 5 minutos em um termociclador e aplicadas ao gel. O marcador de peso molecular utilizado foi *HiMark™ Unstained HMW Protein Standard*, da *Invitrogen*.

A eletroforese foi realizada em cuba (*XCellSureLockTMMini-Cell/Invitrogen*), contendo tampão LDS (*Invitrogen*), sendo aplicados 150 V por 2 h. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas do gel para uma membrana *Invitrolon* PVDF (*Invitrogen, EUA*), utilizando-se o sistema *XCell IITMBlot Module* (*Invitrogen*), segundo instruções do fabricante. A voltagem aplicada foi de 30 V durante 5 h.

A imunodeteção e visualização das proteínas foram realizadas com o uso do kit “*Western Breeze Chemiluminescent Immunodetection System*” (*Invitrogen*), segundo instruções do fabricante. A membrana foi submetida a uma solução de bloqueio por 1 h, para posterior marcação com o anticorpo primário por no mínimo 5 h. Após essa marcação, a membrana foi lavada 3 x com solução de lavagem e depois incubada com o anticorpo secundário por 30 min. Após incubação com o secundário, a membrana foi lavada por 3 x com solução de lavagem e finalizando com 2 lavagens de água Milli-Q. Os anticorpos utilizados foram: anti-SOD1 (1:1000, *Cell Signaling Technology, Inc., EUA*), anti-TP53 (1:500, *Cell Signaling Technology, Inc., EUA*) e anti-β-Actina (ACTB) (1:1000, *Cell Signaling Technology, Inc., EUA*).

Para a leitura, as membranas foram retiradas da água Milli-Q e incubadas com 1 mL de substrato quimioluminescente por 5 minutos, aproximadamente. Para a captura das imagens das bandas na membrana foi utilizado o equipamento *ImageQuantLas 500* (*GE healthcare Life Sciences*).

3.7 Análise estatística

Os dados obtidos deste trabalho foram analisados pelo *software SPSS Statistics 23.0* (SPSS Inc., USA) e aceitou-se significância estatística com $p < 0,05$.

Para a análise dos dados obtidos no ensaio cometa, *Western blot* e alterações mitocondriais foi utilizado o teste *t* de Student. Os resultados foram apresentados como média ($\bar{x}$) $\pm$ desvio padrão.

As análises estatísticas dos dados de expressão gênica relativa, obtidos por RT-qPCR, foram realizadas por comparações pareadas entre os grupos CCL e N-CCL, as quais se basearam na comparação dos genes de interesse com um gene endógeno (*B2M*, gene de referência). Foram utilizados os valores de $2^{-\Delta\Delta ct}$, calculados em planilhas do *Microsoft Office Excel 2016*, para a análise estatística, foi utilizado o teste *t*, a partir dos valores exportados do *StepOne Real time PCR System*. Os gráficos foram realizados utilizando o programa *SPSS v.23* para *Windows*.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Grupo de amostras

Foram coletadas amostras de 30 indivíduos, 19 N-CCL e 11 CCL, totalizando 10 (33,3%) homens e 20 (66,6%) mulheres.

Em relação à idade dos indivíduos envolvidos na pesquisa, no grupo N-CCL, esta variou de 74 a 94 anos, enquanto que no grupo CCL, a variação foi entre 66 a 87 anos, sendo as médias dos grupos semelhantes. No grupo N-CCL (**Tabela 2**), em relação à etnia declarada pelos participantes, foram amostrados 18 brancos (94,5%) e apenas um negro (5,5%), enquanto no grupo CCL, todos os indivíduos apresentaram etnia branca. Todos os indivíduos de ambos os grupos frequentaram o ensino fundamental por pelo menos 2 anos (**Tabela 2 e 3**).

Tabela 2 - Caracterização de pacientes N-CCL, incluindo código de amostra, sexo (M: masculino; F: feminino), idade, etnia, escolaridade e patologia. *: Quantidade de anos frequentados na escola. P. A.: Peso Adequado; H.A.S.: Hipertensão Arterial Sistêmica; MAN.: Mini Avaliação Nutricional.

Amostra N-CCL	Sexo	Idade	Etnia	Escolaridade*	Patologias	MAN
1.0.18.01	F	86	Branco	4	Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS); transtorno de Ansiedade	P. A.
1.0.18.02	F	83	Branco	3	HAS; Labirintopatia	P. A.
1.0.18.03	M	82	Branco	6	HAS	P. A.
1.0.18.04	F	76	Branco	12	HAS; Hiperuricemia; Litíase renal	P. A.
1.0.18.05	F	75	Branco	4	HAS; catarata; Herniorrafia Iguinal Bilateral; apendicectomia	P. A.
1.0.18.06	F	94	Branco	11	Hipotireoidismo; HAS; labirintite; Bócio tireoidiano	P. A.
1.0.18.07	M	85	Branco	18	HAS	P. A.
1.0.18.08	M	83	Negro	4	HAS; hipotireoidismo;	P. A.
1.0.18.09	F	82	Branco	12	HAS	P. A.
1.0.18.10	M	80	Branco	8	HAS	P. A.
1.0.18.11	F	90	Branco	4	HAS; Hipotireoidismo	P. A.
1.0.18.12	F	74	Branco	16	HAS; Tremor essencial	P. A.
1.0.18.13	F	82	Branco	12	HAS; Hipotireoidismo	P. A.
1.0.18.14	M	79	Branco	3	HAS	P. A.

4.2 Danos no DNA

Para esse ensaio, foram avaliados 17 indivíduos N-CCL e 9 CCL (**Tabela 4**). Além do cometa alcalino convencional, foi também realizada uma outra versão do ensaio cometa, utilizando a enzima hOGG1, visto que a propriedade de endonuclease dessa enzima permite reconhecer e clivar sítios de bases 8-oxodG oxidadas na molécula de DNA, gerando fragmentos que são detectados pelo ensaio cometa.

Os resultados mostraram um aumento nos níveis de danos oxidativos nos pacientes com CCL, relativamente ao grupo N-CCL ($p < 0,05$) (**Figura 3A**); por outro lado, por meio do ensaio convencional, não foram observadas diferenças significativas entre os dois grupos (**Figura 3B**).

Tabela 4 - Valores das médias $\pm$ desvio padrão das porcentagens de DNA na cauda.

Parâmetro	Ensaio Convencional		Ensaio com hOGG1	
	N-CCL (N=17)	CCL (N=9)	N-CCL (N=17)	CCL (N=9)
% de DNA na cauda	2,9 $\pm$ 1,05	2,707 $\pm$ 1,05	20,09 $\pm$ 8,92	35,35 $\pm$ 4,33

Figura 3 - Danos no DNA avaliados pelo ensaio cometa

(A) Representação das células mononucleares do sangue periférico dos indivíduos CCL e N-CCL, as quais foram submetidas ao ensaio cometa, tratados ou não com a enzima hOGG1. As imagens foram adquiridas no programa *Comet Assay IV*. **(B e C)** Porcentagens de DNA na cauda e desvio padrão obtidas para os dois grupos de indivíduos. Análise estatística teste *t* para amostras pareadas (com e sem hOGG1 e de amostras não pareadas em relação aos grupos (N-CCL e CCL). * $p < 0,001$, indica diferença estatisticamente significativa quando comparado ao N-CCL.

Fonte: elaborado pelo autor.

4.3 Expressão gênica transcricional

Os RNAs totais apresentaram níveis de pureza adequados após a quantificação com relação às razões A260/280; A260/230 variando entre 1,8–2,2. Posteriormente, a integridade das amostras de RNA foi avaliada para determinação dos valores de RIN, sendo consideradas como adequadas as amostras com RIN > 7.0.

Foi realizada a etapa da purificação para a realização da transcrição reversa. Os cDNAs foram submetidos à eletroforese em gel de agarose para certificar a ocorrência de transcrição reversa e amplificação. Foi possível observar uma banda correspondente ao gene *B2M*, de aproximadamente 123 pb (**Figura 4**).

Figura 4 - Amplificação do gene endógeno *B2M* em gel de agarose.

MM: Marcador molecular; BR: Branco; 01/02/03: N° da amostra.

Fonte: elaborado pelo autor.

A análise de expressão gênica por PCR em tempo real foi realizada para as amostras de PBMC de 6 indivíduos N-CCL e 6 CCL, sendo determinada a expressão dos genes: *MTH1*, *ATM*, *ATR* e *CDKN1A*, utilizando como referência o gene *B2M* (**Figura 5**).

Figura 5 – Curvas de amplificação gênica por RT-qPCR

(A) amostras de N-CCL e (B) CCL, indicando a amplificação dos genes *B2M*, *MTH1*, *ATM*, *ATR* e *CDKN1A*.

Fonte: elaborado pelo autor.

Os resultados obtidos mostraram que o gene *CDKN1A* foi o único que apresentou diferença significativa ($p=0,027$) nos níveis de expressão gênica na comparação entre o grupo CCL com N-CCL, havendo aumento de expressão no grupo CCL (**Figura 6D; Tabela 5**); por outro lado, a expressão de *ATM*, *ATR* e *MTH1* não diferiram significativamente entre os dois grupos (**Tabela 5, Figuras 6A, B e C**).

Tabela 5 – Expressão relativa de genes avaliados por RT-qPCR em PBMC de idosos N-CCL e CCL. Valores representados como média $\pm$ desvio padrão. * $p= 0,01$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparado os grupos.

Genes	Expressão relativa	
	N-CCL (N=6)	CCL (N=6)
<i>MTH1</i>	0,67 $\pm$ 0,16	0,81 $\pm$ 0,21
<i>ATM</i>	0,93 $\pm$ 0,41	0,78 $\pm$ 0,10
<i>ATR</i>	0,58 $\pm$ 0,22	0,60 $\pm$ 0,20
<i>CDKN1A</i>	0,85 $\pm$ 0,10	1,73 $\pm$ 0,75*

Figura 6 - Expressão gênica relativa dos genes avaliados por RT-qPCR em PBMC de pacientes N-CCL e CCL

(A) *MTH1*, (B) *ATM*, (C) *ATR*, (D) *CDKN1A*. Os valores de expressão foram normalizados de acordo com a expressão do gene *B2M*. O gráfico é apresentado na forma de mediana. Foi utilizado o teste *t* para amostras não pareadas para comparação entre os grupos. * $p=0,01$, indica diferença estatisticamente significativa quando comparado ao N-CCL.

Fonte: elaborado pelo autor.

4.4 Alterações mitocondriais

Nos ensaios para as avaliações comparativas de PBMC para alguns parâmetros relacionados com a integridade mitocondrial, foi realizado por: quantificação de superóxido mitocondrial, por meio do *Mitosox* (1,5 μM); detecção de alterações do potencial de membrana, com o uso de TMRM, Tetrametilrodamina metil éster percolorato, (40 ηM) e quantificação da massa mitocondrial com a utilização do reagente *MitoTracker green* FM (50 ηM), além da detecção de superóxido intracelular, a partir do reagente fluorescente DHE, *dihidroetídio*, (1,5 μM) de parâmetros mitocondriais nos dois grupos estudados, foram utilizados os seguintes reagentes: *Mitosox*, DHE, TMRM e *Mitotracker*, sendo avaliados 10 indivíduos N-CCL e oito CCL.

Comparando-se os dois grupos, foi observado um aumento significativo na massa mitocondrial ($p < 0,05$) em indivíduos com CCL. Por outro lado, alterações no potencial de membrana, presença de superóxido intracelular e mitocondrial não diferiram significativamente entre os grupos (**Tabela 6 e Figura 7**).

Tabela 6 – Valores médios obtidos para os parâmetros mitocondriais em idosos N-CCL e CCL. Valores representados como média $\pm$ desvio padrão;

Parâmetros mitocondriais	Intensidade de Fluorescência Média	
	N-CCL (N=10)	CCL (N=8)
Superóxido mitocondrial	15,35 $\pm$ 5,77	16,28 $\pm$ 4,90
Superóxido intracelular	12,20 $\pm$ 2,12	13,6 $\pm$ 2 2,48
Potencial de Membrana Mitocondrial	77,96 $\pm$ 36,32	106,1 $\pm$ 8,82
Massa Mitocondrial	26,06 $\pm$ 13,32	40,96 $\pm$ 31,12*

* $p < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Figura 7 – Resultado da análise de parâmetros mitocondriais em PBMC de pacientes N-CCL e CCL, avaliadas em termos de intensidade de fluorescência média

(A) Quantificação de superóxido mitocondrial analisado pela intensidade de fluorescência média (IFM) em unidade arbitrária (U. A.) emitida por *MitoSox Red*. **(B)** Quantificação de superóxido intracelular medido pela IFM analisado pelo DHE. **(C)** Determinação do potencial de membrana mitocondrial avaliado pelo IFM do TMRM. **(D)** Avaliação da massa mitocondrial pela IFM do *MitoTracker Green*. Os valores são representados como média $\pm$ desvio padrão. *p<0,05, indica diferença estatisticamente significativa quando comparado ao N-CCL.

Fonte: elaborado pelo autor.

4.5 Expressão de SOD1 e TP53

Para a análise de expressão proteica, foram utilizadas amostras de PBMC de indivíduos N-CCL (n=7) e pacientes com CCL (n=6), sendo avaliados os níveis de expressão das proteínas superóxido dismutase 1 (SOD1) e da proteína supressora de tumor (TP53).

Com relação à expressão de SOD1, foi observada uma redução na expressão dessa proteína (18,5 %) no grupo CCL, embora não significativa (**Figura 8**).

A expressão da proteína TP53 apresentou um aumento significativo ($p < 0,05$) de aproximadamente 187% nos indivíduos CCL, comparativamente às amostras N-CCL, (**Figura 9 A, B**). Os pontos circulares referem-se aos valores de expressão relativa para cada indivíduo N-CCL avaliado, enquanto que os pontos quadrangulares referem-se aos mesmos valores adquiridos de amostras de pacientes com CCL.

Figura 8 – Expressão relativa de SOD1 (~18kDa) em indivíduos N-CCL e CCL, normalizada por meio da expressão da proteína endógena β -actina

Os valores foram expressos em porcentagens média ($\pm$ desvio padrão). Os pontos circulares referem-se às amostras de indivíduos N-CCL e pontos quadrangulares às amostras de pacientes com CCL. Gráfico e estatística gerados pelo *Software GraphPad Prism 6*.

Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 9 - Análise de expressão proteica

(A) Expressão relativa de TP53 (~53kDa) e SOD1 (~18kDa) avaliada nos indivíduos N-CCL e pacientes com CCL, normalizadas a partir da expressão da proteína endógena β -actina (ACTB) (~45kDa). As imagens das bandas foram obtidas no aparelho *ImageQuantLas 500* (GE Healthcare Life Sciences) e quantificadas pelo *Software Image Studio Lite* (Li-Cor® *Image Studio Software*). (B) Expressão relativa de TP53 (~53kDa) analisadas para os grupos de indivíduos N-CCL e com CCL, normalizada a partir da expressão da proteína endógena β -actina. Os dados são apresentados em porcentagem média ($\pm$ desvio padrão). Pontos circulares referem-se às amostras de indivíduos N-CCL e pontos quadrangulares às amostras de pacientes com CCL. Gráfico e estatística gerados pelo *Software GraphPad Prism 6*. * $p < 0,05$, indica diferença estatisticamente significativa quando comparado ao N-CCL.

Fonte: elaborado pelo autor.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Os indivíduos com CCL apresentam um maior risco à progressão demencial, sendo que o estresse oxidativo constitui um dos fatores que aumenta a suscetibilidade desses pacientes ao processo demencial. Segundo dados da literatura, há um vasto conjunto de resultados que apontam que o estresse oxidativo pode estar diretamente relacionado ao desenvolvimento de doenças demenciais (MILLER, BUETTNER et al., 1990; LOBO et al., 2010). Desse modo, é importante proceder à avaliação das alterações moleculares relacionadas aos danos oxidativos.

No presente trabalho, os dados obtidos no ensaio cometam demonstram que os danos basais à molécula de DNA em idosos com e sem CCL foram semelhantes, demonstrando que não existe alteração no mecanismo de reparo do DNA para danos em nível basal. Por outro lado, com relação aos níveis de danos oxidativos, foi verificado que pacientes com CCL apresentam elevados níveis desses em PMBC. Os resultados do presente estudo com pacientes CCL e de Leandro et al. (2013), o qual foi realizado em pacientes com a DA, mostraram que não existe alteração no mecanismo basal de reparo do DNA e que idosos apresentam maiores níveis de danos oxidativos e diminuição da atividade de reparo do DNA em PBMC, o que foi estritamente associado a anormalidades metabólicas e oxidativas.

Provavelmente, os pacientes com CCL podem estar no estágio inicial do processo neurodegenerativo, pois apresentaram maiores níveis de dano oxidativo no DNA em relação aos indivíduos sadios (GARCÍA-BLANCO et al., 2017). Esses resultados corroboram a hipótese de que o dano oxidativo pode desempenhar um papel importante no início do processo de neurodegeneração, já que as ROS apresentam uma variedade de biomoléculas como alvo, inclusive o DNA pode ser o alvo primário, resultando em lesões que contribuem para a degeneração e o envelhecimento celular (PHANIENDRA et al., 2015).

De fato, vários estudos mostram que lesões oxidativas ao DNA genômico podem ser importantes causadores de danos neuronais associados ao envelhecimento e doenças neurodegenerativas (MARKESBERY E LOVELL, 2006). O aumento do dano oxidativo no DNA em pacientes com declínio cognitivo pode ser provavelmente resultante de uma diminuição no mecanismo de defesa antioxidante, bem como à deficiência de um sistema de reparo específico para bases oxidadas (IIDA

et al., 2002). Assim, os níveis de dano oxidativo (8-oxodG) nos CCL observados no presente estudo estão de acordo com as informações da literatura. Sendo assim, nossos dados indicam que danos oxidativos no DNA estão presentes em indivíduos com CCL. Em conjunto, esses achados podem se mostrar úteis no futuro como um biomarcador potencial para detecção precoce do desenvolvimento do CCL.

A manutenção da estabilidade genômica depende da ação coordenada de vários processos celulares, como a duplicação do DNA, reparo do DNA, progressão do ciclo celular e outros. A via de sinalização de resposta a danos no DNA monitorada pelas proteínas ATM e ATR quinases é muito importante na percepção de danos no DNA. Desta forma, ATM e ATR são ativados por danos no DNA e estresse de duplicação do DNA; além de serem distintas as funções não são redundantes. Além disso, ATM e ATR geralmente atuam na sinalização de danos no DNA e influenciam a sinalização de controle do ciclo celular (MARECHAL e ZOU, 2013).

Os genes *ATM* e *ATR* codificam as proteínas quinases que são capazes de ativar uma resposta de sinalização aos danos no DNA, como quebras de fita dupla, e danos causados por ROS (SHILOH, 2003). Devido ao alto nível de dano oxidativo encontrado no grupo CCL, seria esperada a indução transcricional dos genes *ATM* e *ATR*, porém, esta não foi encontrada, não havendo diferença significativa entre os grupos de pacientes com CCL e N-CCL.

Outro gene analisado foi o *CDKN1A*, que codifica uma proteína da família dos inibidores do complexo CDK/ciclina, conhecida como p21, cuja função mais conhecida reside no controle da transição G1/S do ciclo celular (KIM et al., 1993). No presente estudo, um aumento na expressão desse gene foi observado no grupo CCL. A indução transcricional do gene *CDKN1A* pode ser regulada por vias dependentes e não dependentes de TP53 (MACLEOD, 1995). A proteína p21 pode causar bloqueio do ciclo celular por ligação e inibição da atividade catalítica de quinases dependentes de ciclina (CDK), incluindo os principais complexos ciclina/CDK, contendo ciclina A, ciclina D ou ciclina E (KARIMIAN et al., 2016). A expressão de p21 é característica da senescência celular, e também ocorre durante a resposta ao dano no DNA (EI-DEIRY et al., 1994; CHANG et al., 1999). A indução de p21 é frequentemente impulsionada pela atividade transcricional da p53, especialmente em cenários de dano ao DNA (MACLEOD, 1995). Entretanto, a expressão de p21 também pode ser desencadeada por uma variedade de mecanismos independentes de p53 (MACDONALD et al., 2014). Em geral, a p53 é necessária para a indução de p21 após dano ao DNA, mas

a importância da p53 para a indução de p21 em outras circunstâncias varia (MACLEOD, 1995; HE et al., 2005; ECKNER, 2012).

Assim, a indução da transcrição de *CDKN1A* em linfócitos, como demonstrado no presente estudo, pode estar associada a altos níveis de estresse em linfócitos, como ocorre em de pacientes com DA, reforçando o envolvimento da via TP53. Isso é compatível com a maior expressão da proteína TP53 no grupo de indivíduos CCL, em comparação com indivíduos N-CCL, observados no presente estudo.

Neste trabalho, foi observada uma leve tendência ao aumento da expressão do gene *MTH1* em linfócitos de pacientes com CCL. Foi estabelecido que a 8-oxo-dGTP, uma forma oxidada de dGTP, representa a principal fonte endógena de mutações espontâneas (CHENG, 1992; MAKI e SEKIGUCHI, 1992), que pode ser eliminada por várias vias de reparo.

O gene *MTH1* codifica a proteína MTH1, que pode desempenhar um papel importante na manutenção da fidelidade da duplicação e transcrição do DNA, protegendo assim o organismo do desenvolvimento do câncer e da degeneração neuronal (NAKABEPPU, 2001). Song et al. (2011) e Leandro et al. (2013) demonstraram que o gene *MTH1* teve expressão reduzida em pacientes com DA, sendo sugerido que a deficiência de *MTH1* pode ser um fator relacionado ao processo de envelhecimento e a doenças relacionadas à idade. Pela análise dos dados obtidos, as vias de proliferação celular parecem ter um papel importante no processo demencial.

A proteína MTH1, um ortólogo de MutT em *Escherichia coli*, é importante para hidrolisar a 8-oxo-dGTP na forma de monofosfato, eliminando substratos alterados do *pool* de precursores de DNA (MAKI, 1996). A proteína MTH1 hidrolisa eficientemente a 8-oxo-GTP, minimizando os erros causados pela incorporação incorreta de nucleotídeos de guanina oxidadas no DNA (TADDEI, 1997).

O acúmulo de 8-oxodG no genoma celular pode culminar em mutagênese ou morte celular programada, e é, portanto, minimizada pelas ações de MTH1 e hOGG1. Estudos em camundongos com nocaute nos genes *Mth1/Ogg1/Mutyh* demonstraram que os sistemas de defesa minimizam eficientemente o acúmulo de 8-oxodG e assim mantêm baixa incidência de mutagênese espontânea e carcinogênese. Nesses camundongos aumentaram o acúmulo de 8-oxodG no genoma, mas exibiram pouca suscetibilidade à carcinogênese espontânea, revelando assim que o acúmulo de 8-oxodG no genoma

induz a morte celular. Os ratos nocauteados para os genes *Mth1/Ogg1* são altamente vulneráveis à neurodegeneração em condições de estresse oxidativo, enquanto que a super-expressão de hMTH1 previne eficientemente a neurodegeneração, evitando o acúmulo de 8-oxodG em genomas mitocondriais de neurônios e/ou genomas nucleares de micróglia, indicando que o aumento da expressão de MTH1 pode ser benéfico para tecidos neuronais (NAKABEPPU et al. 2017).

Os resultados obtidos para os pacientes com CCL mostram que é possível identificar parâmetros moleculares relacionados à condição de estresse oxidativo em PBMC de pacientes que já apresentam certo nível inicial de declínio cognitivo. Isso pode indicar que algumas alterações não ocorrem apenas em nível de sistema nervoso central, mas podem estar relacionadas a níveis sistêmicos, possíveis de serem detectados no sangue periférico dos pacientes.

Com relação a alterações mitocondriais, foi observado que em doenças neurodegenerativas, o aumento da produção de ROS e a disfunção mitocondrial são consequências da senescência celular e podem contribuir causalmente para o envelhecimento e declínio cognitivo dos organismos (WILEY et al., 2014; NITA E GRZYBOWSKI, 2016). Segundo Wang e colaboradores (2014), as mitocôndrias de pacientes com demência apresentam disfunções nos processos de fissão e fusão mitocondrial, sendo que a expressão das proteínas relacionadas com as vias responsáveis pela fissão se mostrou significativamente aumentada. Isso explicaria o fato de ter sido observado um aumento na massa mitocondrial em pacientes com CCL, como consequência do aumento do número de mitocôndrias. Por outro lado, o aumento das mitocôndrias pode ser relacionado a problemas de estresse oxidativo observados na DA e, possivelmente, no CCL, conforme dados do presente estudo.

O aumento na massa mitocondrial foi observado na ausência de duplicação do DNA nuclear, pois a alteração da massa mitocondrial na célula pode ser desacoplada da biossíntese controlada pelo ciclo do DNA cromossômico. No processo de crescimento e na divisão celular é necessário que ocorra a duplicação dos constituintes celulares para a distribuição equitativa dos componentes às duas células-filhas. A proporção de volume mitocondrial para celular é mantida, assim como o número de genomas mitocondriais por célula. Porém, os mecanismos responsáveis pela coordenação da síntese de DNA nuclear e mitocondrial e pelo aumento do balanceamento do tamanho das células e das mitocôndrias não são bem compreendidos (SAZER e SHERWOOD, 2000; MISHRA et., 2014).

Sazer e Sherwood (1990) demonstraram que o DNA nuclear e mitocôndria possuem diferentes mecanismos, através de observações no ciclo de divisão celular. Observou-se que quando não há um bloqueio na duplicação celular, ocorre um aumento no conteúdo de DNA mitocondrial e a ausência de duplicação do DNA nuclear. Isso demonstra que os processos de síntese de DNA nuclear e mitocondrial não estão vinculados, obrigatoriamente. As proteínas mitocondriais e de reparo de DNA nuclear que são codificadas pelo mesmo gene podem frequentemente ser distinguidas devido à presença ou ausência de um sinal de direcionamento mitocondrial, sendo que as sequências de sinal podem ser geradas através de "*splicing*" alternativo, iniciação de transcrição alternativa ou iniciação de tradução alternativa (KAZAK et al., 2012).

Em experimentos realizados *in vitro*, foi observado aumento da massa mitocondrial em fibroblastos humanos sob estresse oxidativo e durante a senescência celular replicativa. Há vários relatos de biogênese mitocondrial ocorrendo na ausência de um aumento no número de cópias do mtDNA, (LEE e WEI, 2005, STAB et al., 2016). Além disso, há evidências crescentes de aumentos similares na massa e/ou proliferação de mitocôndrias em vários tipos de células durante a morte celular por apoptose (MANCINI et al ., 1998; MAHYAR-ROEMER ET AL ., 2001; KLUZA ET AL ., 2004).

A biogênese mitocondrial é o processo no qual há o aumento da massa mitocondrial nas células. Na maioria dos casos, a biogênese mitocondrial ocorre em resposta ao *déficit* de energia, desencadeada pelo aumento da demanda de energia celular ou pela deficiência na síntese de ATP (VALERA-ALBERNI e CANTO, 2018). Portanto, não é surpreendente que ambas as situações compartilhem, pelo menos em parte, mecanismos comuns para aumentar o número de cópias mitocondriais. De acordo com o aumento da massa mitocondrial obtido neste trabalho, é plausível que o aumento constitua uma resposta precoce ao estresse pelo qual a célula se adapta a novas demandas de energia e reparo de lesões, para o aumento das chances de sobrevivência (LEE e WEI, 2005). Isso está de acordo com o acúmulo progressivo de ROS e a redução na expressão proteica da SOD1.

Neste estudo, os resultados obtidos quanto à quantidade de ROS mitocondrial não foram significativos para o grupo CCL, o que pode indicar que esses pacientes provavelmente apresentam uma atividade considerável de defesa antioxidante, diferentemente da DA, condição na qual a disfunção mitocondrial neuronal é uma

característica precoce e proeminente nos pacientes (WANG, 2009), assim como o metabolismo energético reduzido no cérebro dos mesmos (LANDAU 2011; SHOKOUHI 2013; YAMANE 2013). Foi também relatada uma diminuição da expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo, bem como redução na expressão ou atividade de muitas enzimas envolvidas no metabolismo oxidativo, em cérebros de pacientes com DA (PARKER, 1994; GIBSON 1998; NAGY 1999; COTTRELL, 2001).

Em relação à expressão da proteína TP53, esta apresentou um aumento significativo nos indivíduos CCL, comparativamente às amostras do grupo N-CCL. Os resultados obtidos quanto à expressão das proteínas SOD1 e TP53 podem ser comparados com dados de experimentos anteriores do laboratório para pacientes DA (LEANDRO et al., 2013); nesse estudo, foi observado um maior nível de expressão de TP53 para o grupo DA em relação ao grupo controle. A TP53 é uma proteína supressora de tumor que regula negativamente o ciclo celular e o mecanismo de resposta a danos no DNA, tendo uma série de genes como alvo.

Normalmente, a TP53 possui papel relacionado ao controle do ciclo celular e apoptose (ZHOU e JIA, 2010), podendo ser encontrada em duas formas estruturais: funcionalmente ativa (selvagem) e funcionalmente inativa (mutada). A estrutura selvagem possui meia-vida curta dentro das células e são recrutadas mediante estresse oxidativo, quando ativam seus alvos reguladores, possibilitando a parada do ciclo celular, sendo posteriormente degradadas pelo complexo ubiquitina proteassoma.

No entanto, há evidência de que em pacientes com DA, as TP53 possuem mudanças conformacionais que as tornam funcionalmente inativas (ZOHU e JIA, 2010). Outra explicação plausível para o aumento de expressão de TP53 pode ser a relação com disfunções no sistema ubiquitina-proteassoma encontrados em pacientes com DA. Como esse complexo está diretamente relacionado com a degradação dessa proteína no meio celular, a associação desses fatores em pacientes com CCL poderia justificar os níveis aumentados de TP53 encontrados em PBMC, da mesma forma que relatado para os pacientes com DA, comparados aos controles de idosos saudáveis, conforme relatado por Leandro et al. (2013).

A outra proteína avaliada (SOD1) neste trabalho é uma enzima antioxidante, que atua principalmente convertendo radicais livres em espécies menos reativas de oxigênio e peróxido de hidrogênio, sendo envolvida diretamente com as vias de

estresse oxidativo dos organismos (LEANDRO et al., 2013; BOSCO, 2015). A SOD1, que decompõe os radicais livres de superóxido como uma das principais enzimas antioxidantes nas células humanas, é frequentemente exposta a níveis mais altos de estresse oxidativo do que a maioria das outras proteínas, devido à natureza, função e localização celular (PETROV et al., 2016).

Assim, os resultados obtidos para SOD1 em pacientes com CCL foram semelhantes aos de Leandro et al. (2013) obtidos para pacientes com DA; da mesma forma, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas, mas uma leve tendência de redução nos pacientes com DA. Essa leve redução pode representar algum significado fisiológico em termos de estresse oxidativo em consequência da diminuição da atividade dessa enzima nos pacientes de ambos os grupos. Entretanto, conforme já mencionado, não foram encontradas alterações ao nível de mitocôndria nos pacientes CCL avaliados, sugerindo que as atividades antioxidantes estejam razoavelmente bem desempenhadas. Contudo, esta abordagem ainda requer estudos com maior número de pacientes.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Os resultados da avaliação de danos ao material genético mostraram que os níveis basais de danos no DNA são semelhantes entre os grupos de pacientes CCL e N-CCL, mas as lesões oxidativas (8-oxodG) foram significativamente elevadas nos pacientes CCL.

Em relação aos níveis de expressão transcricional dos genes *ATM*, *ATR* e *MTH1*, estes não diferiram entre os grupos estudados, porém, foi observado um aumento significativo na expressão do gene *CDKN1A* nos indivíduos CCL em comparação ao grupo N-CCL, sugerindo um possível comprometimento da regulação do ciclo celular nos pacientes CCL.

Os resultados obtidos referentes à quantidade de ROS total, ROS mitocondrial e potencial de membrana não forneceram suporte à hipótese deste trabalho, visto que não foram detectadas diferenças significativas entre os pacientes CCL e N-CCL, indicando que a condição CCL não apresenta alterações semelhantes às apresentadas pelos pacientes com DA, pelo menos no que se refere aos parâmetros acima citados, analisados no presente trabalho. Entretanto, os pacientes do grupo CCL apresentaram níveis de massa mitocondrial elevados comparados ao grupo N-CCL.

Assim, o aumento de massa mitocondrial e a alta expressão relativa da proteína TP53 indicaram que existem alterações moleculares e mitocondriais que estão relacionadas com o declínio cognitivo e não são provavelmente decorrentes do envelhecimento normal do organismo. Entretanto, um estudo mais aprofundado desses parâmetros com um maior número de indivíduos poderá fornecer dados mais consistentes quanto à possibilidade de utilização de tais análises como indicadores de progressão do CCL para a DA.

Em conjunto, os resultados do presente trabalho, ainda que com um número de amostras limitado, indicam que lesões oxidativas, alterações na expressão de TP53 e na massa mitocondrial dos pacientes CCL possam representar características relevantes nos estágios iniciais da demência, mas ainda, sem manifestações fenotípicas de maior gravidade.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS ¹

- ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL. World Alzheimer Report 2018: The Global Impact of Dementia. **Alzheimer's Disease International**. <https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2018.pdf> 2018.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. PERSONALITY DISORDERS. In. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (5th ed.)** p. 645-684. Arlington, VA: American Psychiatric Publishing. 2013.
- AVRAMOPOULOS, D. Genetics of Alzheimer's disease: recent advances. **Genome Med.** v. 1, p. 34. 2009.
- BHAT, A.H., DAR, K.B., ANEES, S., ZARGAR, M.A., MASOOD, A., SOFI, M.A., GANIE, S.A. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. **Biomed pharmacother.** v. 74, p.101-110. 2015.
- BLENNOW, K.; LEON, M. J.; ZETTERBERG, H. "Alzheimer's disease." **Lancet.** v. 388, ed. 10043, p. 505-517. 2016.
- BOLISSETTY, S. E., JAIMES, E. A. Mitochondria and reactive oxygen species: physiology and pathophysiology. **Int J Mol Sci.** v. 19, ed. 14, p. 6306-6344. 2013.
- BOTTINO, C. M. C.; STOPPE, JR. A.; SCALCO, A.Z.; FERREIRA, R.C.R.; HOTOTIAN, S.R.; SCALCO, M.Z. Validade e confiabilidade da versão brasileira do CAMDEX. **Arq Neuropsiquiat.** v. 59, p. 20. 2001.
- BRUCKI, S. M. D. Epidemiology of Mild Cognitive Impairment in Brazil. **Dementia Neuropsychologia**, v. 7, p. 363, 2013.
- BRUNER, S. D.; NORMAN, D.P.G., VERDINE, G. L. Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA. **Nature.** v. 403, p. 859-866. 2000.
- BURHANS, W. C. & WEINBERGER, M. DNA replication stress, genome instability and aging. **Nucleic Acids Res.** v. 35, p. 7545–7556. 2007.
- CARVALHO, C.; ZHU, X.; SMITH, M.A.; PERRY G. Mitochondrial dysfunction is a trigger of Alzheimer's disease pathophysiology. **BBA-Mol. Basis Dis.** v. 1802, p. 2-10. 2010.
- CHANG, Y.T., CHANG, W.N., TSAI, N.W., et al. The roles of biomarkers of oxidative stress and antioxidant in Alzheimer's disease: a systematic review. **Biomed Res Int.** v. 2014, p. 182. 2014.
- CHANG, B.D., XUAN, Y., BROUDE, E.V., ZHU, H., SCHOTT, B., FANG, J., ET AL. Role of p53 and p21waf1/cip1 in senescence-like terminal proliferation arrest induced in human tumor cells by chemotherapeutic drugs. **Oncogene.** v. 18, p. 4808–4818. 1999.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

- CHENG, K.C., CAHILL, D.S., KASAI, H., NISHIMURA, S., LOEB, L.A. 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G—T and A—C substitutions. **J. Biol. Chem.** v. 267, p. 166–172. 1992.
- CLEMENTE, R. S. G.; RIBEIRO-FILHO, S. T. Comprometimento Cognitivo Leve: aspectos conceituais, abordagem clínica e diagnóstica. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**. 2008. v. 7, n. 1, p 68-77.
- COTTRELL, D.A., BLAKELY, E.L., JOHNSON, M.A., INCE, P.G., TURNBULL, D.M. Mitochondrial Enzyme-Deficient Hippocampal Neurons and Choroidal Cells in **Ad. Neurology**. v. 57, p. 260–264. 2001.
- CUMMINGS, J. L. Integrating ADNI results into Alzheimer's disease drug development programs. **Neurobiol. Aging**. v. 31, p. 1481-1492. 2010.
- DEBRABANT, B., SOERENSEN, M., FLACHSBART, F., DATO, S., MENGEL-FROM, J., STEVNSNER, T., BOHR, V.A., KRUSE, T.A., SCHREIBER, S., NEBEL, A., CHRISTENSEN, K., TAN, Q., CHRISTIANSEN, L. Human longevity and variation in DNA damage response and repair: study of the contribution of sub-processes using competitive gene-set analysis. **Eur J Human Genet**. v. 22, ed.9, p.1131-1136. 2014.
- ECKNER R. p53-dependent growth arrest and induction of p21: a critical role for PCAF-mediated histone acetylation. **Cell Cycle**. v. 11, p. 2591–2592. 2012.
- EL-DEIRY, W.S., HARPER, J.W., O'CONNOR, P.M., VELCULESCU, V.E., CANMAN, C.E., JACKMAN, J., ET AL. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. **Cancer Res**. V. 54, p. 1169–1174. 1994.
- ESHKOOR, S.A., HAMID, T.A., NUDIN, S.S., MUN, C.Y. Does substance abuse contribute to further risk of falls in dementia. **Neuropsychol Dev Cogn B Aging Neuropsychol Cogn**. v. 21, p. 317-324. 2014.
- FOLSTEIN, M.F., FOLSTEIN, S.E., MCHUGH, P.R. 'Mini Mental State': a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. **Journal of Psychiatric Research** v. 12, p. 189-198. 1975.
- FRED, H. L. The diagnosis of exclusion: an ongoing uncertainty. **Tex Heart Inst J**. v. 40, ed. 4, p. 379-381. 2013.
- GARCÍA-BLANCO, A., BAQUERO, M., VENTO, M., GIL, E., BATALLER, L., AND CHÁFER-PERICÁS, C. Potential oxidative stress biomarkers of mild cognitive impairment due to Alzheimer disease. **J. Neurol. Sci**. v. 373, p. 295–302. 2017.
- GARCÍA-ESCUADERO, V.; MARTÍN-MAESTRO, P.; PERRY, G.; AVILA J. Deconstructing mitochondrial dysfunction in Alzheimer disease. **Oxid. Med. Cell. Longev**. v. 2013, p. 13. 2013.
- GAUTHIER, S., REISBERG, B., ZAUDIG, M., PETERSEN, R.C., RITCHIE, K., BROICH, K., BELLEVILLE, S., BRODATY, H., BENNETT, D., CHERTKOW, H., CUMMINGS, J.L., DE LEON, M., FELDMAN, H., GANGULI, M., HAMPEL, H., SCHELTENS, P., TIERNEY, M.C., WHITEHOUSE, P., WINBLAD, B. Mild cognitive impairment. **Lancet**. v. 367, ed. 9518, p. 1262-1270. 2006.
- GIBSON, G.E., SHEU, K.F., BLASS, J.P. Abnormalities of Mitochondrial Enzymes in Alzheimer Diseases. **J. Neural Transm**. v. 105, p. 885–870. 1998.

- GORLOVOY, P.; LARIONOV, S.; PHAM, T.T.; NEUMANN, H. Accumulation of tau induced in neurites by microglial proinflammatory mediators. **FASEB J.** v. 23, p. 2502–2513. 2009.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. Free radicals and antioxidant protection: mechanisms and significance in toxicology and disease. **Hum Toxicol.** v.7, p.7-13.1988.
- HE, G.; SIDDIK, Z.H.; HUANG, Z.; WANG, R.; KOOMEN, J.; KOBAYASHI, R.; KHOKHAR, A.R.; KUANG, J. Induction of p21 by p53 following DNA damage inhibits both Cdk4 and Cdk2 activities. **Oncogene.** v. 24, p. 2929–2943. 2005.
- HIRAI, K., ALIEV, G., NUNOMURA, A., FUJIOKA, H., RUSSELL, R.L., ATWOOD, C.S., JOHNSON, A.B., KRESS, Y., VINTERS, H.V., TABATON, M., SHIMOHAMA, S., CASH, A.D., SIEDLAK, S.L., HARRIS, P.L., JONES, P.K., PETERSEN, R.B., PERRY, G., SMITH, M.A. Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. **J Neurosci.** v. 21, n. 9, p. 3017–3023. 2001.
- HUGHES, C.P, BERG, L., DANZIGER, W.L, COBEN, L.A, MARTIN, R.L. A new clinical scale for the staging of dementia. **British Journal of Psychiatry.** v. 140, p. 566-572.1982
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Projeção da população do Brasil por sexo e idade para o período 2000/2060. **IBGE.** 2019.
- IBGE. Tábua completa de mortalidade para o Brasil – 2015. Textos para discussão, Diretoria de Pesquisas. **IBGE.** V. 56 Rio de Janeiro, 2018.
- IOM (Institute of Medicine). Blazer, D.G., Yaffe, K., Liverman, C.T. **Cognitive aging: progress in understanding and opportunities for action.** Washington, DC: The National Academies Press. Committee on the Public Health Dimensions of Cognitive Aging. 2015.
- ISAACS, A. M., SENN, D.B., YUAN, M., SHINE, J.P., YANKNER, B.A. Acceleration of amyloid beta-peptide aggregation by physiological concentrations of calcium. **J Biol Chem.** v. 281, n. 38, p. 27916–27923. 2006.
- IYAMA, T.; WILSON, D. M. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. **DNA repair.** v. 12, ed. 8, p. 620-636. 2013.
- KANE, R.L., BUTLER, M., FINK, H.A., BRASURE, M., DAVILA, H., DESAI, P., JUTKOWITZ, E., MCCREEDY, E., NELSON, V.A., MCCARTEN, J.R., CALVERT, C., RATNER, E., HEMMY, L.S., BARCLAY, T. **Interventions To Prevent Age-Related Cognitive Decline, Mild Cognitive Impairment, and Clinical Alzheimer's-Type Dementia. Comparative Effectiveness Review.** n. 188. Rockville, M.D.: Agency for Healthcare Research and Quality. March 2017.
- KARIMIAN, A., AHMADI, Y., YOUSEFI, B. Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. **DNA Repair.** v. 42, p.63-71. 2016.
- KATZ, S.; FORD, A.B.; MOSKOWITZ, R.W.; JACKSON, B.A.; JAFFE, M.W. Studies of illness in the aged. The index of ADL: a standardized measure of biological and psychosocial function. **JAMA.** v. 185, ed.12, p. 914-9. 1963
- KENNEDY, B.K., BERGERM, S. L., BRUNET, A., CAMPISI, J., CUERVO, A.M., EPEL, E.S., FRANCESCHI, C., LITHGOW, G.J., MORIMOTO, R.I., PESSIN, J.E. Geroscience: linking aging to chronic disease. **Cell.** v. 159, ed. 4., p. 709-713.

- KIM, G. H., KIM, S. J., RHIE, R. J., YOON, S. The role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. **Exp Neurobiol.** v. 24, ed. 4, p. 325–340. 2015.
- KNIGHT, J.N.Y. Anatomy and physiology of ageing 5: the nervous system. **Nursing Times.** v. 113, n. 6, p. 55-58. 2017.
- KONG, Y., TRABUCCO, S.E., ZHANG, H. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and the mitochondria theory of aging. **Interdiscip Top Gerontol.** v. 39, p. 86-107 2014.
- KAZAK, L. REYES, A. HOLT, I.J. Minimizing the damage: repair pathways keep mitochondrial DNA intact. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** v. 13, p. 659-671. 2012.
- LANDAU, S.M., HARVEY, D., MADISON, C.M., KOEPPE, R.A., REIMAN, E.M., FOSTER, N.L., WEINER, M.W., JAGUST, W.J. Alzheimer's Disease Neuroimaging, Associations between Cognitive, Functional, and Fdg-Pet Measures of Decline in AD and MCI. **Neurobiol Aging.** v. 32, p.1207–1218. 2011.
- LEANDRO, G. S., LOBO, R. R., OLIVEIRA, D. V., MORIGUTI J. C., SAKAMOTO-HOJO, E. T. Lymphocytes of patients with Alzheimer's disease display different DNA damage/repair kinetics and expression. Profiles of DNA repair and stress response genes. **Int J Mol Sci.** v. 14, ed. 6, p. 380-400. 2013.
- LEE, H.C., WEI, Y.H. Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress. **Int J Biochem Cell Biol.** v. 37, p. 822–834. 2005.
- LEE, H.C., YIN, P.H., LU, C.Y., CHI, C.W., WEI, Y.H. Increase of mitochondria and mitochondrial DNA in response to oxidative stress in human cells. **The Biochemical journal.** v. 348, p. 425–432. 2000.
- LIU, Z., ZHOU, T., ZIEGLER, A.C., DIMITRION, P., ZUO, L. Oxidative Stress in neurodegenerative Diseases: From Molecular Mechanisms to Clinical Applications. **Oxid Med Cell Longev.** v. 2017, p. 2525-2967. 2017.
- LOBO, V., PATIL, A., PHATAK A., CHANDRA, N. “Free Radicals, Antioxidants and Functional Foods: Impact on Human Health.” **pHarmacognosy Reviews.** v. 4, ed.8, p. 118–126. 2010.
- LÓPEZ-OTÍN. C., BLASCO, M.A., PARTRIDGE, L., SERRANO, M., KROEMER, G. The hallmarks of aging. **Cell.** v. 153, p.1194–1217. 2013.
- LOVELL, M.A., MARKESBERY, W.R. Oxidative DNA damage in mild cognitive impairment and late-stage Alzheimer's disease. **Nucleic acids research.** v. 35, p. 7497-7504. 2007.
- MACDONALD, F.H., YAO, D., QUINN, J.A., GREENHALGH, D.A. PTEN ablation in Ras (Ha)/Fos skin carcinogenesis invokes p53-dependent p21 to delay conversion while p53-independent p21 limits progression via cyclin D1/E2 inhibition. **Oncogene.** v. 33, p. 4132–4143. 2014.
- MACLEOD, K.F., SHERRY, N., HANNON, G., BEACH, D., TOKINO, T., KINZLER, K. p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. **Genes Dev.** v. 9, p. 935–944. 1995.
- MAKI, H., SEKIGUCHI M. MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis. **Nature.** v. 355, p. 273–275. 1992.

- MARECHAL, A., ZOU L. DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.** v. 1, p. 5. 2013.
- MARKESBERRY, W.R., SCHMITT, F.A., KRYSCIO, R.J., DAVIS, D.G., SMITH, C.D., WEKSTEIN, D.R. Neuropathologic substrate of mild cognitive impairment. **Archives of neurology.** v. 63, ed. 1, p. 38-46. 2006.
- MCEVOY, L.K., FENNEMA-NOTESTINE, C., RODDEY, J.C., HAGLER, D.J., JR, HOLLAND, D., KAROW, D.S., PUNG, C.J., BREWER, J.B., DALE, A.M., Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative Alzheimer disease: quantitative structural neuroimaging for detection and prediction of clinical and structural changes in mild cognitive impairment. **Radiology.** v. 251, ed. 1, p.195-205. 2009.
- MCKHANN, G.; DRACHMAN, D.; FOLSTEIN, M.; KATZMAN, R.; PRICE, D.; STADLAN, E. M. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. **Neurology.** v. 34, ed. 7, p. 939-944. 1984.
- MICHELAKOS, T., KOUSOULIS, A.A., KATSIARDANIS, K., DESSYPRIS, N., ANASTASIOU, A., KATSIARDANI, K. Serum Folate and B12 Levels in Association with Cognitive Impairment Among Seniors: Results from the VELESTINO Study in Greece and Meta-Analysis. **J Aging Health.** v. 25, ed. 4, p. 589-616. 2013.
- MILLER, D. M., BUETTNER, G. R., AUST, S. D. Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. **Free Radic Biol Med.** v. 8, ed. 1, p. 95-108. 1990.
- MISHRA, P., CHAN, D.C. Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** v. 15, p. 634–646. 2014.
- MOORE, E., MANDER, A., AMES, D., CARNE, R., SANDERS, K., WATTERS, D. Cognitive impairment and vitamin B12: a review. **Int Psychogeriatrics.** v. 24, ed. 4, p. 541-556. 2012.
- MOREIRA, P.I. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Alzheimer's disease. **Eur. Neurol. Rev.** v. 1842, ed. 8, p.1240-1247. 2010.
- NAGY, Z., ESIRI, M.M., LEGRIS, M., MATTHEWS, P.M. Mitochondrial Enzyme Expression in the Hippocampus in Relation to Alzheimer-Type Pathology. **Acta Neuropathol.** v. 97, p. 346–354.1999.
- NAKABEPPU, Y. Molecular genetics and structural biology of human MutT homolog, MTH1. **Mutat. Res.** v. 477, p.59–70. 2001
- NAKABEPPU, Y., OHTA E., ABOLHASSANI N. MTH1 as a nucleotide pool sanitizing enzyme: Friend or foe? **Free Radic. Biol. Med.** v. 107, p. 151–158. 2017.
- NESTLÉ. Mini Avaliação Nutricional. **Nestlé Nutrition Services.** 1998.
- NITA, M.; GRZYBOWSKI, A. The Role of the Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in the Pathomechanism of the Age-Related Ocular Diseases and Other Pathologies of the Anterior and Posterior Eye Segments in Adults. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity.** v. 2016, p. 23. 2016.
- NOHMI, T., KIm, S.R., YAMADA, M. Modulation of oxidative mutagenesis and carcinogenesis by polymorphic forms of human DNA repair enzymes. **Mutation Research.** v. 591, p.60-73. 2005.

- OCHOA, J. J., PAMPLONA, R., RAMIREZ-TORTOSA, M. C., GRANADOS-PRINCIPAL, S., PEREZ-LOPEZ, P., NAUDÍ, A., et al. Age-related changes in brain mitochondrial DNA deletion and oxidative stress are differentially modulated by dietary fat type and coenzyme Q10. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 50, p.1053–1064. 2011.
- ODA, H., NAKABEPPU Y., FURUICHI M., SEKIGUCHI M. Regulation of expression of the human MTH1 gene encoding 8-oxo-dGTPase. Alternative splicing of transcription products. **J. Biol. Chem**. v. 272, p.17843–17850. 1997.
- ODAWARA, T. Cautious notification and continual monitoring of patients with mild cognitive impairment. **Psychogeriatrics**. v. 12, ed. 2, p.131-2. 2012.
- OGAWA, S. Nutritional management of older adults with cognitive decline and dementia. **Geriatr Gerontol Int**. v. 14, n. 2, p.17-22. 2014.
- PETROV, D., DAURA, X., ZAGROVIC, B. Effect of Oxidative Damage on the Stability and Dimerization of Superoxide Dismutase 1. **Biophys. J**. v. 110, p. 1499–1509. 2016.
- PHANIENDRA, A., JESTADI, D. B., AND PERIYASAMY, L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. **Indian J. Clin. Biochem**. v. 30, p. 11–26. 2015.
- PINTO, C., SUBRAMANYAM, A.A. Mild cognitive impairment: The dilemma. **Indian J Psychiatry**. v. 51, p. 44–51. 2009.
- RASHID, A.K., AZIZAH, A.M., ROHANA, S. Cognitive impairment among the elderly Malays living in rural Malaysia. **Med J Malaysia**. v. 67, n. 2, p. 186-189. 2012.
- Retz, W., Gsell, W. et al., Free radicals in Alzheimer's disease. **J. Neural Transm Suppl**. v. 54, p. 221-236. 1998.
- SACHDEV, P.S.; LIPNICKI, D.M.; CRAWFORD, J.; REPPERMUND, S.; KOCHAN, N.A.; TROLLOR, J.N.; WEN, W.; DRAPER, B.; SLAVIN, M.J.; KANG, K.; LUX, O.; MATHER, K.A.; BRODATY, H. Factors predicting reversion from mild cognitive impairment to normal cognitive functioning: a population-based study. **PloS One**. v. 8, n. 3. 2013.
- SAHA, A., ADAK, S. Enhanced oxygen releasing capacity and oxidative stress in diabetes mellitus and diabetes mellitus-associated cardiovascular disease: a comparative study. **Clin Chim Acta**. v. 361, n. 1, p.141-149. 2005.
- SANFORD, A. M. Mild Cognitive Impairment. **Clin Geriatr Med**. v. 3, n. 3, p. 325-337 2017.
- SAZER, S. and S.W. Sherwood. Mitochondrial growth and DNA synthesis occur in the absence of nuclear DNA replication in fission yeast. **J. Cell Sci**. v. 97, p. 509–516. 1990.
- SHAO, C., XIONG, S., LI, G.M., GU, L., MAO, G., MARKESBERY, W.R., LOVELL, M.A. Altered 8-oxoguanine glycosylase in mild cognitive impairment and late-stage Alzheimer's disease brain. **Free Radic Biol Med**. v. 45, p. 813–819. 2008.
- SHILOH, Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. **Nat. Rev. Cancer** v. 3, p. 155–168. 2003.

- SHOKOLENKO, I., VENEDIKTOVA, N., BOCHKAREVA, A., WILSON, G. L. & ALEXEYEV, M. F. Oxidative stress induces degradation of mitochondrial DNA. **Nucleic Acids Res.** v. 37, p. 2539–2548. 2009.
- SHOKOLENKO, I., VENEDIKTOVA, N., BOCHKAREVA, A., WILSON, G. L., ALEXEYEV M. F. Oxidative stress induces degradation of mitochondrial DNA. **Nucleic Acids Res.** v. 37, p. 2539–2548. 2009.
- SHOKOUHI, S., CLAASSEN, D., KANG, H., DING, Z., ROGERS, B., MISHRA, A., RIDDLE WR. For the Alzheimer's Disease Neuroimaging, Longitudinal Progression of Cognitive Decline Correlates with Changes in the Spatial Pattern of Brain 18f-Fdg Pet. **J Nucl Med.** v. 54, p. 1564–1569. 2013.
- SILVA, J. P. L. **Comparação dos perfis transcricionais de genes de reparo e duplicação do DNA e medidas de comprimento telomérico entre grupos de indivíduos jovens, idosos e centenários.** Dissertação de mestrado – Departamento de Genética. USP. Ribeirão Preto. 2015.
- SINGH, S. K. S.; SRIVASTAV, A. K.; YADAV, S.; SRIKRISHNA, PERRY, G. Overview of Alzheimer's Disease and Some Therapeutic Approaches Targeting Abeta; by Using Several Synthetic and Herbal Compounds. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity.** v. 2016, n. 7361613. 2016.
- SONG, X. N., ZHANG L.Q., LIU D.G., LIN J., ZHENG J.D., DAI D.P., HEI A.L., HAYAKAWA H., SEKIGUCHI M., CAI J.P. Oxidative Damage to RNA and Expression Patterns of MTH1 in the Hippocampi of Senescence-Accelerated SAMP8 Mice and Alzheimer's Disease Patients. **Neurochem. Res.** v. 36, p.1558–1565. 2011.
- SPERLING, R.A.; RENTZ, D.M.; JOHNSON, K.A.; KARLAWISH, J.; DONOHUE, M.; SALMON, D.P. et al. The A4 study: stopping AD before symptoms begin? **Sci Transl Med.** v. 6, p. 228. 2014.
- STAB, B.R. MARTINEZ, L., GRISMALDO, A., LERMA, A., GUTIÉRREZ, M.L., BARRERA, L.A., SUTACHAN, J.J., ALBARRACÍN, S.L. Mitochondrial functional changes characterization in young and senescent human adipose derived MSCs. **Front Aging Neurosci.**; v. 8, p. 299. 2016.
- TADDEI, F., HAYAKAWA H., BOUTON M., CIRINESI A., MATIC I., SEKIGUCHI M., RADMAN M. Counteraction by MutT protein of transcriptional errors caused by oxidative damage. **Science.** v. 278, p.128–130. 1997
- TANIGUCHI, Y., SHINKAI, S., NISHI, M., MURAYAMA, H., NOFUJI, Y., YOSHIDA, H. Nutritional Biomarkers and Subsequent Cognitive Decline Among Community-Dwelling Older Japanese: A Prospective Study. **Journals Gerontol Ser a Biol Sci Med Sci.** v. 69, n. 10, p.1276-1283. 2014.
- TAO, M. C. A.; HOEFFER, CAPETILLO-ZARATE E.; YU F., WONG H.; LIN T. M.; TAMPELLINI D., KLANN E., BLITZER R. D., GOURAS G. K. Dysregulation of the mTOR pathway mediates impairment of synaptic plasticity in a mouse model of Alzheimer's disease. **PloS One.** v. 20, n. 5. 2010.
- TOSUN, D. et al. Association between tau deposition and antecedent amyloid-beta accumulation rates in normal and early symptomatic individuals. **Brain.** v. 140, p. 1499–1512. 2017.

- TRICCO, A.C., SOOBIAH, C., LILLIE, E., PERRIER, L., CHEN, M.H., HEMMELGARN, B., MAJUMDAR, S.R., STRAUS, S.E. Use of cognitive enhancers for mild cognitive impairment: protocol for a systematic review and network meta-analysis. **Syst Rev.** v. 1, p. 25. 2012.
- VALERA-ALBERNI, M., CANTO, C. Mitochondrial stress management: a dynamic 627 journey. **Cell Stress.** v. 2, p. 253-274. 2018.
- VALLA, J., SCHNEIDER, L., NIEDZIELKO, T., COON, K.D., CASELLI, R., SABBAGH, M.N., AHERN, G.L., BAXTER, L., ALEXANDER, G., WALKER, D.G., REIMAN, E.M. Impaired platelet mitochondrial activity in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. **Mitochondrion.** v. 6, p. 323–330. 2006.
- VILLEMAGNE, V.L., FODERO-TAVOLETTI, M.T., MASTERS, C.L., ROWE, C.C. Tau imaging: early progress and future directions. **Lancet Neurol.** v. 14, p.114–124. 2015.
- WANG, Y., WANG, Y.X., LIU, T., LAW, P.Y., LOH, H.H., QIU, Y., CHEN, H.Z. μ -Opioid receptor attenuates A β oligomers-induced neurotoxicity through mTOR signaling. **CNS Neurosci Ther.** v. 21, n. 1., p. 8-14. 2015.
- WARD, A., ARRIGHI, H.M., MICHELS, S., CEDARBAUM, J.M. Mild cognitive impairment: disparity of incidence and prevalence estimates. **Alzheimers Dement.** v. 8, n. 1, p. 14-21. 2012.
- WILEY L, ASHOK D, MARTIN-RUIZ C, TALBOT DCS, COLLERTON J, KINGSTON A, ET AL. Reactive Oxygen Species Production and Mitochondrial Dysfunction in White Blood Cells Are Not Valid Biomarkers of Ageing in the Very Old. **PLoS ONE.** v. 9, n. 3. 2014.
- WISDOM, N.M., MIGNOGNA, J., COLLINS, R.L. Variability in Wechsler Adult Intelligence Scale-IV subtest performance across age. Archives of clinical neuropsychology: the official journal of the National Academy of Neuropsychologists. **Arch Clin Neuropsychol.** v. 27, n. 4, p. 389-397. 2012.
- WISDOM, N.M., MIGNOGNA, J., COLLINS, R.L. Variability in Wechsler Adult Intelligence Scale-IV subtest performance across age. **Archives of clinical neuropsychology: the official journal of the National Academy of Neuropsychologists.** v. 27, p. 389–397. 2012.
- YAMANE, T., IKARI Y, NISHIO T, ISHII K, ISHII K, KATO T, ITO K, SILVERMAN DH, SENDA M, ASADA T, ARAI H, SUGISHITA M, IWATSUBO T the J-ADNI Study Group. Visual–Statistical Interpretation of 18f-Fdg-Pet Images for Characteristic Alzheimer Patterns in a Multicenter Study: Inter-Rater Concordance and Relationship to Automated Quantitative Evaluation. **AM J Neuroradiol.** v. 35, p. 244-249. 2013
- YATES, S.C., et al. Dysfunction of the mTOR pathway is a risk factor for Alzheimer's disease. **Acta Neuropathol Commun.** v. 8, p.1-3. 2013.
- YU, D., CORBETT, B., YAN, Y., ZHANG, G.X., REINHART, P., CHO, S.J., CHIN, J. Early cerebrovascular inflammation in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging.** v. 33, n. 12, p. 2942-2947. 2012.
- ZHAO, Y., S. BHATTACHARJEE, P. DUA, P. N. ALEXANDROV; W. J. LUKIW "microRNA-Based Biomarkers and the Diagnosis of Alzheimer's Disease." **Front Neurol.** v. 6, p. 162. 2015.

- ZHOU, X., JIA, J.: P53-mediated G1/S checkpoint dysfunction in lymphocytes from Alzheimer's disease patients. **Neurosci Lett**. v. 468, p.320–325. 2010.
- ZWART, J. P., MEERMAN, J. H. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. **Free Radic Biol Med**. v. 26, n.1-2, p. 202-226. 1999.

ANEXOS

8. ANEXOS

ANEXO A – Aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ofício Nº 3778/2017
CEP/MGV

RIBEIRÃO PRETO, 15 DE DEZEMBRO DE 2017

PREZADOS SENHORES,

O TRABALHO INTITULADO "ESTRESSE OXIDATIVO E ALTERAÇÕES NA EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS À LONGEVIDADE E REPARO DO DNA EM IDOSOS COM DIFERENTES GRAUS DE DECLÍNIO COGNITIVO, COMPARADOS A INDIVÍDUOS COM IDADE INTERMEDIÁRIA" – VERSÃO 2, DE 19/10/2017, FOI ANALISADO "AD REFERENDUM" PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA E ENQUADRADO NA CATEGORIA: **APROVADO**, BEM COMO O **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - VERSÃO 2, DE 19/10/2017** E O **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – CONTROLES – VERSÃO 2, DE 19/10/2017**, DE ACORDO COM O PROCESSO HCRP Nº 12465/2017.

DE ACORDO COM CARTA CIRCULAR Nº 003/2011/CONEP/CNS, DATADA DE 21/03/2011, O SUJEITO DE PESQUISA OU SEU REPRESENTANTE, QUANDO FOR O CASO, DEVERÁ RUBRICAR TODAS AS FOLHAS DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE – APODO SUA ASSINATURA NA ÚLTIMA DO REFERIDO TERMO; O PESQUISADOR RESPONSÁVEL DEVERÁ DA MESMA FORMA, RUBRICAR TODAS AS FOLHAS DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE – APODO SUA ASSINATURA NA ÚLTIMA PÁGINA DO REFERIDO TERMO.

ESTE COMITÊ SEGUE INTEGRALMENTE A CONFERÊNCIA INTERNACIONAL DE HARMONIZAÇÃO DE BOAS PRÁTICAS CLÍNICAS (IGH-GCP), BEM COMO A RESOLUÇÃO Nº 466/12 CNS/MS.

LEMBRAMOS QUE DEVEM SER APRESENTADOS A ESTE CEP, O RELATÓRIO PARCIAL E O RELATÓRIO FINAL DA PESQUISA.

ATENCIOSAMENTE.

DRª. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
COORDENADORA DO COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DO HCRP E DA FMRP-USP

ILUSTRÍSSIMOS SENHORES

JOHNATHAN DE ANDRADE VIEIRA
PROFª.DRª. ELZA TIEMI SAKAMOTO HOJO(ORIENTADORA)
DEPTO. DE GENÉTICA – FMRP-USP

ANEXO B – termo de consentimento livre e esclarecido dos indivíduos sadios**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

Campus Universitário Monte Alegre – CEP 14.048-900 – FONE: 633-1000

RIBEIRÃO PRETO – SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - CONTROLES

NOME DA PESQUISA: Estresse oxidativo e alterações na expressão de genes associados à longevidade e reparo do DNA em idosos com diferentes graus de declínio cognitivo, comparados a indivíduos com idade intermediária.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Johnathan de Andrade Vieira

ENDEREÇO PARA CONTATO: Av. Bandeirantes, 3900; CEP: 14.049-900

Laboratório de Citogenética e Mutagênese, Bloco G - Departamento de Genética - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP)

TELEFONE: (16) 3315-3082

Convidamos o senhor (a) a participar do projeto de pesquisa intitulado: ESTRESSE OXIDATIVO E ALTERAÇÕES NA EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS À LONGEVIDADE E REPARO DO DNA EM IDOSOS COM DIFERENTES GRAUS DE DECLÍNIO COGNITIVO, COMPARADOS A INDIVÍDUOS COM IDADE INTERMEDIÁRIA.

A pesquisa será realizada pelo biólogo Johnathan de Andrade Vieira, mestrando em Genética pelo departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, que realizará um estudo sobre o Comprometimento Cognitivo Leve (CCL). O CCL, explicando de forma simples, é uma alteração que afeta a capacidade cognitiva, que é a forma como o nosso cérebro percebe, aprende, recorda e pensa sobre toda e qualquer informação observada no dia a dia. Essa alteração pode ocorrer de maneira mais acentuada do que o normal conforme a idade das pessoas. As células que serão coletadas do seu sangue serão analisadas por vários testes genéticos para detectar possíveis alterações no material genético ou hereditário, na tentativa de comparar os pacientes com CCL e diferenciá-los dos indivíduos sadios. O benefício desta pesquisa não é imediato, será a longo prazo, esperamos conseguir resultados que possam contribuir para o entendimento do processo de envelhecimento, mesmo que o presente estudo não possa beneficiar diretamente os pacientes.

Para a realização desta pesquisa, é necessária a participação de pessoas sadias que não apresentam comprometimento na cognição, para comparar os resultados entre os grupos

sadios (controles) e doentes (com CCL). Portanto, será necessária à coleta de 20 ml de sangue periférico (equivalente a duas colheres de sopa), por punção venosa, com material descartável. O incômodo e a dor são referentes a picada de agulha, mas não haverá risco à saúde, porém há o risco de ocorrência de hematoma. Também será necessário a coleta de 50 ml de urina (equivalente a cinco colheres de sopa) pelo próprio indivíduo, afim de amenizar o desconforto e constrangimento e não apresenta riscos.

Não haverá nenhum gasto para o participante para realização da coleta de sangue e também não haverá remuneração pela contribuição, sendo que todos os exames de sangue e custos serão de total responsabilidade dos pesquisadores. O material biológico coletado do senhor (a) será utilizado exclusivamente para atender aos objetivos desta pesquisa e, caso haja sobra, serão devidamente eliminados ao final do estudo.

Caso aceite participar da pesquisa, receberá uma via deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, que deverá ser assinado e rubricado em todas as páginas pelo participante e pelo pesquisador. Asseguramos que a sua participação será confidencial e não haverá sua identificação em nenhum trabalho científico, porém há o risco de quebra de sigilo e/ou identificação dos sujeitos da pesquisa. De modo algum será obrigado a colaborar com a pesquisa e, mesmo que concordar agora, poderá mais tarde se retirar da pesquisa, a qualquer momento, se assim o desejar.

Para esclarecer quaisquer dúvidas ou acompanhar o andamento e resultados obtidos do trabalho, sobre a utilização do material biológico na pesquisa, sempre que achar necessário, escrever para vieirajohnathan@usp.br ou telefonar para (16) 3602-3082 ou (62) 9 9124-2628 e falar com Johnathan de Andrade Vieira (mestrando) ou com a Prof.^a. Dr^a. Elza T. Sakamoto Hojo (orientadora do aluno). Para quaisquer dúvidas éticas, telefonar para o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (16) 3602-2228.

Tendo ciência do exposto acima, assino abaixo.

Eu, _____, portador do R.G. _____, abaixo assinado, tendo recebido as informações supracitadas, ciente dos meus direitos acima relacionados e diante dos esclarecimentos prestados, concordo em participar da pesquisa da qualidade de voluntário.

Ribeirão Preto, _____ de _____ de 20____.

Participante: _____

Assinatura: _____

Pesquisador: _____

Assinatura: _____

ANEXO C – Termo de consentimento livre e esclarecido dos pacientes**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

Campus Universitário Monte Alegre – CEP 14.048-900 – FONE: 633-1000

RIBEIRÃO PRETO – SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - PACIENTES

NOME DA PESQUISA: Estresse oxidativo e alterações na expressão de genes associados à longevidade e reparo do DNA em idosos com diferentes graus de declínio cognitivo, comparados a indivíduos com idade intermediária.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Johnathan de Andrade Vieira

ENDEREÇO PARA CONTATO: Av. Bandeirantes, 3900; CEP: 14.049-900

Laboratório de Citogenética e Mutagênese, Bloco G - Departamento de Genética - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP)

TELEFONE: (16) 3315-3082

Convidamos o senhor (a) a participar do projeto de pesquisa intitulado: ESTRESSE OXIDATIVO E ALTERAÇÕES NA EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS À LONGEVIDADE E REPARO DO DNA EM IDOSOS COM DIFERENTES GRAUS DE DECLÍNIO COGNITIVO, COMPARADOS A INDIVÍDUOS COM IDADE INTERMEDIÁRIA.

A pesquisa será realizada pelo biólogo Johnathan de Andrade Vieira, mestrando em Genética pelo departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, que realizará um estudo sobre o Comprometimento Cognitivo Leve (CCL). O CCL, explicando de forma simples, é uma alteração que afeta a capacidade cognitiva, que é a forma como o nosso cérebro percebe, aprende, recorda e pensa sobre toda e qualquer informação observada no dia a dia. Essa alteração pode ocorrer de maneira mais acentuada do que o normal conforme a idade das pessoas. As células que serão coletadas do seu sangue serão analisadas por vários testes genéticos para detectar possíveis alterações no material genético ou hereditário, na tentativa de comparar os pacientes com CCL e diferenciá-los dos indivíduos sadios. O benefício da pesquisa não é imediato, será a longo prazo, mas esperamos conseguir resultados que possam contribuir para o entendimento do processo de envelhecimento e do declínio cognitivo, mesmo que o presente estudo não possa beneficiar diretamente os pacientes.

Para a realização desta pesquisa, é necessária a participação de pessoas sadias que não apresentam comprometimento na cognição, para comparar os resultados entre os grupos sadios (controles) e doentes (com CCL). Portanto, será necessária a coleta de 20 ml

de sangue periférico (equivalente a duas colheres de sopa), por punção venosa, com material descartável. O incômodo e a dor são referentes a picada de agulha, mas não haverá risco à saúde, porém há o risco de ocorrência de hematoma. Também será necessário a coleta de 50 ml de urina (equivalente a cinco colheres de sopa) pelo próprio indivíduo, afim de amenizar o desconforto e constrangimento e não apresenta riscos; além da aplicação de questionários, que pode causar um pequeno cansaço ou desconforto durante a aplicação.

Não haverá nenhum gasto para o participante para realização da coleta de sangue e também não haverá remuneração pela contribuição, sendo que todos os exames de sangue e custos serão de total responsabilidade dos pesquisadores. O material biológico coletado do senhor (a) será utilizado exclusivamente para atender aos objetivos desta pesquisa e, caso haja sobra, serão devidamente eliminados ao final do estudo.

Caso aceite participar da pesquisa, receberá uma via deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, que deverá ser assinado e rubricado em todas as páginas pelo participante e pelo pesquisador. Asseguramos que a sua participação será confidencial e não haverá sua identificação em nenhum trabalho científico, porém há o mínimo risco de quebra de sigilo e/ou identificação dos sujeitos da pesquisa. De modo algum será obrigado a colaborar com a pesquisa e, mesmo que concordar agora, poderá mais tarde se retirar da pesquisa, a qualquer momento, se assim o desejar.

Para esclarecer quaisquer dúvidas ou acompanhar o andamento e resultados obtidos do trabalho, sobre a utilização do material biológico na pesquisa, sempre que achar necessário, escrever para vieirajohnathan@usp.br ou telefonar para (16) 3602-3082 ou (62) 9 9124-2628 e falar com Johnathan de Andrade Vieira (mestrando) ou com a Prof.^a. Dr^a. Elza T. Sakamoto Hojo (orientadora do aluno). Para quaisquer dúvidas éticas, telefonar para o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (16) 3602-2228.

Tendo ciência do exposto acima, assino abaixo.

Eu, _____, portador do R.G. _____, abaixo assinado, tendo recebido as informações supracitadas, ciente dos meus direitos acima relacionados e diante dos esclarecimentos prestados, concordo em participar da pesquisa da qualidade de voluntário.

Ribeirão Preto, _____ de _____ de 20____.

Participante: _____

Assinatura: _____

Pesquisador: _____

Assinatura: _____