

MONIQUE PATRICIO SINGULANI

**Análise da biogênese e disfunção mitocondrial na progressão da
doença de Alzheimer em camundongos 3xTg-AD**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Luiz Roberto G. Britto

Versão Original

São Paulo
2019

RESUMO

SINGULANI, M. P. **Análise da biogênese e disfunção mitocondrial na progressão da doença de Alzheimer em camundongos 3xTg-AD.** Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A doença de Alzheimer (DA) caracteriza-se por perda neuronal associada as placas senis e emaranhados neurofibrilares (NFTs). Disfunção mitocondrial também foi encontrada na DA, bem como expressão reduzida do coativador 1 α do receptor gama ativado pelo proliferador de peroxissoma (PGC-1 α), um importante regulador da biogênese mitocondrial. No entanto, ainda não está claro até que ponto o comprometimento da biogênese mitocondrial influencia na disfunção das mitocôndrias no início e na progressão da DA. Neste estudo foi investigado a biogênese e a função mitocondrial, bem como o fenótipo comportamental de um modelo animal para a DA, o camundongo 3xTg-AD, avaliado nas idades de 1, 2, 4 e 6 meses. Primeiramente, avaliamos o genótipo e características histopatológicas através da técnica de imunohistoquímica, confirmando o modelo utilizado. Demonstramos alterações significativas na expressão de PGC-1 α avaliadas nas regiões CA1 do hipocampo e do giro dentado de camundongos 3xTg-AD, bem como níveis reduzidos de expressão de mRNA de PKAC- α , CREB, PGC-1 α , NRF1, NRF2 e TFAM nos camundongos 3xTg-AD desde a idade de 1 mês. Camundongos 3xTg-AD também demonstraram redução da expressão proteica de pCREB/CREB, PGC-1 α , NRF1 e TFAM, sugerindo que a biogênese mitocondrial provavelmente está prejudicada em idades precedentes ao desenvolvimento da doença. Além disso, camundongos 3xTg-AD de 4 e 6 meses de idade apresentaram diminuição do conteúdo mitocondrial, avaliado pela expressão proteica de VDAC2, e da função mitocondrial, demonstrado pela redução da expressão proteica do complexo IV, bem como nas atividades dos complexos II + III e IV. Esses resultados sugerem que o comprometimento da biogênese mitocondrial é um evento que antecede o desenvolvimento das manifestações patológicas da DA, podendo contribuir para o desencadeamento desta doença. Quando analisado o fenótipo comportamental, camundongos 3xTg-AD demonstraram redução da atividade exploratória, avaliado pelo teste de campo aberto (CA), e comportamento semelhante a ansiedade e depressão, avaliados pelos testes de CA, labirinto em “zero” elevado (LZE) e teste de nado forçado, desde a idade de 1 mês, e

comportamento anedônico, avaliado pelo teste de preferência por solução de sacarose, com 6 meses de idade. No teste de reconhecimento de um novo objeto, observamos comprometimento da memória de curto prazo (MCP) nos camundongos 3xTg-AD de 4 meses, e de MCP e longo prazo (MLP) nos camundongos 3xTg-AD de 6 meses. Em conjunto, esses dados sugerem que o comprometimento precoce da biogênese mitocondrial pode ter contribuído para o desencadeamento de alterações comportamentais neuropsíquicas, e a redução do conteúdo junto ao comprometimento da função mitocondrial e desenvolvimento da patologia amilóide podem ter sido implicados no déficit cognitivo e no agravamento desta patologia. Coletivamente, de uma perspectiva terapêutica, a melhora da biogênese mitocondrial em estágios iniciais da DA pode ser uma abordagem farmacológica promissora para prevenir, retardar e/ou impedir o desenvolvimento desta doença.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer. Camundongos 3xTg-AD. Biogênese mitocondrial. Disfunção mitocondrial.

ABSTRACT

SINGULANI, M. P. **Analysis of biogenesis and mitochondrial dysfunction in the progression of Alzheimer's disease in 3xTg-AD mice.** Thesis (Ph. D. thesis in Human Physiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Alzheimer's disease (AD) is characterized by neuronal loss associated with senile plaques and neurofibrillary tangles (NFTs). Mitochondrial dysfunction was also found in AD, as well as a reduction of the expression of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha (PGC-1 α), an important regulator of mitochondrial biogenesis. However, it is not yet clear to what extent the impairment of mitochondrial biogenesis influences mitochondrial dysfunction at the onset and progression of AD. This study investigated the biogenesis and mitochondrial function, as well as the behavioral phenotype in an animal model of AD, the 3xTg-AD mouse, evaluated at the ages of 1, 2, 4 and 6 months. First, we evaluated the genotype and histopathological characteristics by immunohistochemical technique, confirming the animal model used. We demonstrated significant changes in PGC-1 α expression evaluated in the hippocampal CA1 and dentate gyrus tissues of 3xTg-AD mice, as well as a reduction of the mRNA expression levels of *PKAC- α* , *CREB*, *PGC-1 α* , *NRF1*, *NRF2* and *TFAM* in 3xTg-AD mice since the age of 1 month. 3xTg-AD mice also demonstrated reduced protein expression of pCREB/CREB, PGC-1 α , NRF1 and TFAM, suggesting that mitochondrial biogenesis is probably impaired at ages preceding the disease development. In addition, 3xTg-AD mice of 4 and 6 months showed decreased mitochondrial content, assessed by VDAC2 protein expression, and mitochondrial function, demonstrated by reduced complex IV protein expression, as well as in complex II + III and IV activities. These results suggesting that the impairment of mitochondrial biogenesis is an event that precedes the development of pathological manifestations of AD and may contribute to the onset of this disease. When the behavioral phenotype was analyzed, 3xTg-AD mice demonstrated reduced exploratory activity, as assessed by open field test (OFT), and behaviors related to anxiety and depression, as assessed by the OFT, elevated zero maze test (EZM) and forced swim test, at 1 month of age, and anhedonic behavior, assessed by the sucrose solution preference test, at 6 months of age. In the novel object recognition test, we observed impairment of the short-term memory (STM) in 4-month 3xTg-AD mice, and STM and

long-term memory (LTM) in 6-month 3xTg-AD mice. Taken together, these data suggest that early impairment of mitochondrial biogenesis may have contributed to the onset of neuropsychic behavioral changes, and reduced content associate with impaired mitochondrial function and development of amyloid pathology may have been implicated in cognitive impairment and worsening of this pathology. Collectively, from a therapeutic perspective, improvement of mitochondrial biogenesis in early stages of AD may be a promising pharmacological approach to prevent, retard and / or prevent the development of this disease.

Keywords: Alzheimer's disease. 3xTg-AD mice. Mitochondrial biogenesis. Mitochondrial dysfunction.

1 INTRODUÇÃO

O envelhecimento populacional é um fenômeno global. Essa mudança na demografia populacional é consequência do acentuado declínio na taxa de fertilidade e do aumento da expectativa de vida. Nas últimas décadas, a velocidade no processo de transição demográfica e epidemiológica vivenciada globalmente tem motivado a atenção de gestores e pesquisadores dos sistemas de saúde por refletir em implicações biológicas, sociais, econômicas e políticas (HAMPEL; PRVULOVIC; TEIPEL; JESSEN *et al.*, 2011). Biologicamente, o envelhecimento é definido como um declínio funcional, dependente do tempo, o qual afeta a maioria dos organismos vivos. Esse declínio funcional resulta na perda da integridade fisiológica e, por sua vez, está associado a uma predisposição a múltiplas patologias relacionadas a idade, tais como doenças cardiovasculares, câncer, diabetes e distúrbios neurológicos (GUNN-MOORE; KAIDANOVICH-BEILIN; GALLEGRO IRADI; GUNN-MOORE *et al.*, 2017; HAMPEL; PRVULOVIC; TEIPEL; JESSEN *et al.*, 2011).

Embora haja sucesso contínuo na promoção da qualidade de vida e a atenção à saúde o envelhecimento é reconhecido como principal fator de risco associado a distúrbios neurodegenerativos que impulsionam a atual epidemia de demências, tal como a doença de Alzheimer (DA) (GUNN-MOORE; KAIDANOVICH-BEILIN; GALLEGRO IRADI; GUNN-MOORE *et al.*, 2017; LEVINE; LU; BENNETT; HORVATH, 2015).

1.1 Doença de Alzheimer

A DA é uma doença neurodegenerativa progressiva, irreversível e heterogênea nos seus aspectos etiológico, clínico e neuropatológico (DENVER; MCCLEAN, 2018). É uma doença caracterizada clinicamente por perda de memória, comprometimento da função cognitiva, alterações comportamentais, declínio progressivo da linguagem e comprometimento das funções motoras, levando à completa necessidade de cuidados dentro de alguns anos após o diagnóstico clínico e morte prematura do indivíduo idoso (BRAAK; BRAAK, 1997; LEVINE; LU; BENNETT; HORVATH, 2015; QUERFURTH; LAFERLA, 2010).

A DA acomete principalmente indivíduos na senescência sendo, desta forma, considerada uma das principais causas de demência em pessoas com mais de 60 anos. A prevalência global de demência nessa faixa etária foi estimada em 24 milhões em 2001, sendo que a previsão é que estes valores dupliquem a cada 20 anos, afetando mais de 80 milhões de indivíduos no mundo até 2040 (HAMPEL; PRVULOVIC; TEIPEL; JESSEN *et al.*, 2011). O aumento estimável nos casos de DA é atribuído ao número crescente de idosos que correspondem cerca de 60 a 80% dos casos de demência (RYAN; FRANSQUET; WRIGGLESWORTH; LACAZE, 2018). Estima-se que globalmente 35,6 milhões de indivíduos são acometidos com a DA, com custos anuais à saúde de US\$ 315 bilhões (ASSOCIATION, 2015; FRANSQUET; RYAN, 2019). Segundo a Associação Internacional da Doença de Alzheimer (ADI), a incidência da DA duplicará para 65,7 milhões de acometidos em 2030 e 115,4 milhões em 2050 representando, desta forma, grave problema de saúde pública (ASSOCIATION, 2015; FRANSQUET; RYAN, 2019; HAMPEL; PRVULOVIC; TEIPEL; JESSEN *et al.*, 2011).

Embora o envelhecimento seja considerado o principal fator de risco para o desenvolvimento da DA, vários outros fatores contribuem para o desencadeamento da doença, como por exemplo: baixo nível educacional, sedentarismo, histórico de doença vascular, tabagismo, obesidade, diabetes, dentre outros. Tais fatores podem ser usados para avaliar o risco da DA, mas na maioria das vezes não fornecem especificidade suficiente para serem empregados como marcadores de diagnóstico clínico (QUERFURTH; LAFERLA, 2010; REITZ; BRAYNE; MAYEUX, 2011). De fato, diversos fatores de risco ambientais contribuem para o desenvolvimento da doença, porém estudos demonstram que a DA possui um componente genético significativo, associado com o maior risco de desencadeamento da doença, tanto para a forma idiopática quanto para a forma familiar da doença (ESCOTT-PRICE; BELLENGUEZ; WANG; CHOI *et al.*, 2014; SELKOE, 2001).

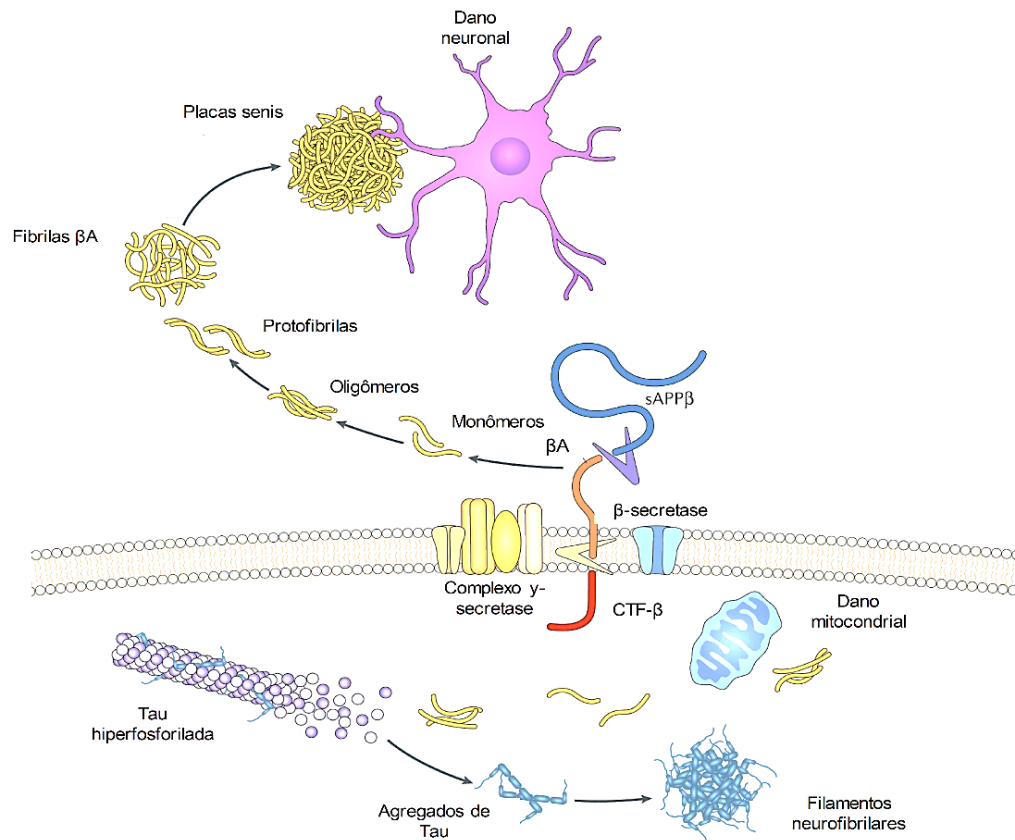
Os casos de DA são comumente classificados em dois tipos, baseados na faixa etária na qual ocorre o aparecimento dos sintomas. A DA familiar atinge cerca de 5 a 15% dos pacientes e tem um acometimento precoce, onde os sintomas geralmente se iniciam antes dos 65 anos de idade. Essa forma da doença é comumente recorrente na família e possui um padrão de herança autossômica dominante, com mutações nos genes da proteína precursora amiloide (APP, do inglês *amyloid precursor protein*) e das proteínas presenilina 1 (PSEN1) e presenilina 2

(PSEN2), as quais constituem as subunidades catalíticas da enzima γ -secretase que, por sua vez, participa da clivagem da APP resultando na geração de peptídeos beta-amilóide (β A) (QUERFURTH; LAFERLA, 2010; SCHEUNER; ECKMAN; JENSEN; SONG *et al.*, 1996), cuja importância será discutida mais adiante. A DA idiopática é a forma mais comum de demência e é geralmente diagnosticada em pacientes com mais de 65 anos de idade. Essa forma de doença apresenta um padrão de herança não mendeliano mas, ainda assim, com componentes claramente herdáveis que orientam sutilmente o processamento da APP para a formação do peptídeo β A (MEZ; MARDEN; MUKHERJEE; WALTER *et al.*, 2017; QUERFURTH; LAFERLA, 2010). O fator de risco genético que comumente se correlaciona com o desenvolvimento da DA em casos idiopáticos é a herança do alelo ϵ 4 da apolipoproteína E (apoE), o qual aumenta até 5 vezes o risco de desenvolvimento da doença (SELKOE, 2001).

De fato, o evento principal na patogenia da maioria das demências neurodegenerativas é a agregação anormal de proteínas, como por exemplo a formação de placas senis decorrentes da deposição do peptídeo β A no parênquima cerebral e de emaranhados neurofibrilares intraneuronais (NFTs, do inglês *neurofibrillary tangles*) na DA (AROSIO, 2017; BRAAK; BRAAK, 1997; QUERFURTH; LAFERLA, 2010). As placas senis são constituídas de agregados de proteína β A formados a partir da clivagem proteolítica anômala da APP. Em condições fisiológicas, a proteína APP é clivada pela enzima α -secretase gerando fragmentos não amiloidogênicos, tais como o fragmento terminal α -carboxila (CTF- α , do inglês *C-terminal fragment alpha*) e o fragmento da APP solúvel α -amino terminal (sAPP α). Já, na DA, sob a ação proteolítica da enzima β -secretase, APP é clivada pela via amiloidogênica resultando na formação de dois fragmentos, o fragmento da APP solúvel β -amino terminal (sAPP β) e o fragmento terminal β -carboxila (CTF- β , do inglês *C-terminal fragment beta*), o qual permanece ligado à membrana plasmática. Sequencialmente, CTF- β é clivada pela enzima γ -secretase gerando diferentes isoformas do peptídeo β A. O peptídeo β A é constituído por 36 a 43 aminoácidos, sendo os monômeros de β A₄₀ as isoformas mais abundantes, e os monômeros de β A₄₂ os produtos com maior capacidade de agregação (AROSIO, 2017; KARRAN; MERCKEN; DE STROOPER, 2011; QUERFURTH; LAFERLA, 2010). O peptídeo β A formado anormalmente pode permanecer no meio intracelular, desencadeando eventos citotóxicos ou pode ser secretado para o meio extracelular, agregando-se em placas senis. O processo de agregação do peptídeo β A ocorre de maneira gradual e

contínua iniciando pela agregação de proteínas monoméricas, oligômeros de baixo peso molecular, seguido da formação de oligômeros alto peso molecular e, gerando posteriormente estruturas como as protofibrilas, fibrilas e placas senis, que culminam na degeneração de neurônios (Figura 1) (AHMED; DAVIS; AUCOIN; SATO *et al.*, 2010; PANZA; LOZUPONE; LOGROSCINO; IMBIMBO, 2019; QUERFURTH; LAFERLA, 2010).

Figura 1. Formação das placas senis e dos emaranhados neurofibrilares



Formação do peptídeo β-amilóide (βA) por meio da clivagem da proteína precursora amilóide (APP) pelas enzimas β- e γ- secretase. O peptídeo βA agrega-se formando monômeros, oligômeros, protofibrilas, fibrilas e placas senis. Na doença de Alzheimer (DA), a proteína tau apresenta-se hiperfosforilada resultando no seu desprendimento do microtúbulo, acúmulo em agregados de tau e formação de emaranhados neurofibrilares (NFTs). Adaptado de Panza et al. (2019) (PANZA; LOZUPONE; LOGROSCINO; IMBIMBO, 2019).

Os NFTs são lesões intraneuronais constituídas de filamentos helicoidais emparelhados (PHF, do inglês *paired helical filament*) de proteína tau hiperfosforilada. Tau é uma proteína pertencente a grande família de proteínas associadas à microtúbulos (MAPs, do inglês *microtubule-associated proteins*), cuja principal função consiste na participação da montagem dos microtúbulos, que constituem o citoesqueleto celular, conferindo-lhes estabilidade. Sua função é regulada pelo estado de fosforilação e desfosforilação, gerando mudanças conformacionais que influenciam na sua interação com as proteínas constituintes do microtúbulo, bem como na promoção da montagem e estabilização destes (AROSIO, 2017; IQBAL; ALONSO; CHEN; CHOCHAN *et al.*, 2005; QUERFURTH; LAFERLA, 2010). Na DA, tau sofre hiperfosforilação principalmente mediada por quinases, como por exemplo a enzima glicogênio sintase quinase-3 beta (GSK-3 β) e a quinase dependente de ciclina 5 (CDK5), adquirindo uma conformação alterada que a torna mais propensa a se agregar com outras proteínas, formando PHF e, conseqüentemente NFTs (Figura 1). Esse processo resulta em uma cascata de eventos, afetando a função neural e sináptica que culmina na morte neuronal (IQBAL; ALONSO; CHEN; CHOCHAN *et al.*, 2005; PANZA; LOZUPONE; LOGROSCINO; IMBIMBO, 2019; QUERFURTH; LAFERLA, 2010).

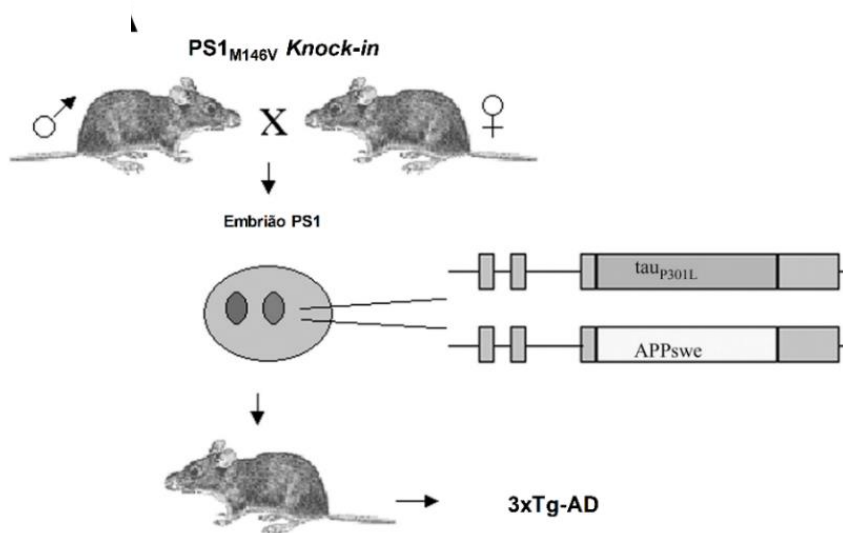
1.2 Modelo animal para o estudo da doença de Alzheimer

Uma importante dificuldade nos estudos de pacientes com a DA é por conta do diagnóstico definitivo realizado somente mediante a comprovação histopatológica *post-mortem* das lesões cerebrais que caracterizam a doença, tais como as placas senis e NFTs (JELLINGER; JANETZKY; ATTEMS; KIENZL, 2008; KARRAN; MERCKEN; DE STROOPER, 2011). Assim, o diagnóstico da DA é realizado a partir da caracterização clínica do declínio cognitivo do paciente, de exames complementares e da exclusão de outros fatores etiológicos, seguindo os critérios NINCDS-ADRDA (*National Institute for Neurological and Communicative Disorders and Stroke – Alzheimer's Disease and Related Disorders Association*) proposto por McKhann *et al.* (1984) (MCKHANN; DRACHMAN; FOLSTEIN; KATZMAN *et al.*, 1984), não havendo um marcador patognomônico. Assim, o diagnóstico da DA é considerado difícil e tido como provável até a confirmação *post-mortem* (JELLINGER; JANETZKY;

ATTEMS; KIENZL, 2008). Além disso, devido à dificuldade na detecção e no estudo de marcadores que antecedem o desencadeamento dos sintomas e das características histopatológicas da DA, modelos animais para a DA tem se tornado cruciais para o estudo desta doença (DUYCKAERTS; POTIER; DELATOUR, 2008).

O camundongo 3xTg-AD representa um modelo animal eficaz para o estudo da DA por desenvolver as duas lesões histopatológicas características desta doença em regiões relevantes do cérebro, tais como a amígdala, o hipocampo e o córtex cerebral (BELFIORE; RODIN; FERREIRA; VELAZQUEZ *et al.*, 2019; ODDO; CACCAMO; KITAZAWA; TSENG *et al.*, 2003; ODDO; CACCAMO; SHEPHERD; MURPHY *et al.*, 2003).

Figura 2. Geração do modelo de camundongos 3xTg-AD



Estratégia utilizada no desenvolvimento do camundongo 3xTg-AD. Neste modelo, células embrionárias colhidas de camundongo transgênico PS1 foram micro-injetadas com dois transgenes, APPSwe e TauP301L. O cruzamento desta nova linhagem de camundongos originou o camundongo modelo de Alzheimer, 3xTg-AD. Adaptado de Oddo et al. (2003) (ODDO; CACCAMO; SHEPHERD; MURPHY *et al.*, 2003)

Esta linhagem de camundongos carrega as mutações em genes codificadores de PS1 (PS1_{M146V}), proteína APP sueca (APP_{Swe}) e proteína tau (Tau_{P301L}) ligados à DA humana. O gene APP_{Swe} é um gene humano com uma mutação associada à DA familiar. O gene PS1_{M146V} é um gene da PSEN1 de camundongos (PS1) que também

possui uma mutação humana associada à DA familiar. Já a mutação de Tau_{P301L} está associada à taupatia relacionada à DA (Figura 2). Desta forma, camundongos 3xTg-AD exibem um fenótipo neuropatológico relacionado com a idade, incluindo tanto a deposição de peptídeo β A e formação de placas amilóides, como o desenvolvimento de NFTs (BELFIORE; RODIN; FERREIRA; VELAZQUEZ *et al.*, 2019; ODDO; CACCAMO; KITAZAWA; TSENG *et al.*, 2003).

No modelo murino 3xTg-AD, células embrionárias colhidas de camundongo (*Knock-in*) homocigoto para a mutação do gene PS1_{M146V} foram micro-injetadas com os genes mutados das proteínas APP_{Swe} e Tau_{P301L}. Esses transgenes foram inseridos no mesmo loco genético, possibilitando a reprodução de ninhadas igualmente triplo-transgênicas e de mesmo *background* genético (129/C57BL6). Além disso, a superexpressão dos genes parece ser restrita ao sistema nervoso central (SNC) sob o comando do promotor Thy1.2. (Figura 2) (ODDO; CACCAMO; KITAZAWA; TSENG *et al.*, 2003).

No camundongo 3xTg-AD a primeira patologia detectável é a imunorreatividade intraneuronal para o peptídeo β A, que ocorre aproximadamente aos 3 meses de idade, seguido pelo desenvolvimento de placas extracelulares no neocórtex e hipocampo, aos 6 meses de idade. Já o desenvolvimento de NFTs ocorre a partir de 12 meses de idade (BELFIORE; RODIN; FERREIRA; VELAZQUEZ *et al.*, 2019; ODDO; CACCAMO; SHEPHERD; MURPHY *et al.*, 2003). A formação de deposição de peptídeos β A no hipocampo é temporalmente relacionada com o desenvolvimento de déficits de memória e aprendizagem, havendo um agravamento com o aparecimento de NFTs. Além disso, tecidos periféricos não apresentam expressões de peptídeos β A, encontrada somente no tecido neuronal (ODDO; CACCAMO; SHEPHERD; MURPHY *et al.*, 2003).

1.3 Doença de Alzheimer e as mitocôndrias

Embora a formação de placas senis e NFTs sejam reconhecidas como as principais características da DA, estudos tem demonstrado baixas correlações entre o acúmulo de peptídeo β A e o comprometimento cognitivo em pacientes com DA (JACK; LOWE; WEIGAND; WISTE *et al.*, 2009; TERRY; MASLIAH; SALMON; BUTTERS *et al.*, 1991). Além disso, estudos clínicos também demonstraram presença

de placas senis em pacientes sem demência avaliados por tomografia por emissão de pósitrons (PET, do inglês *positron emission tomography*) (JANSEN; OSSENKOPPELE; KNOL; TIJMS *et al.*, 2015). Em outro estudo, usando dados clínicos, neuropatológicos e histológicos, coletados pelo NACC (*National Alzheimer's Coordinating Center*), foi demonstrado que 29% dos 919 indivíduos diagnosticados com DA não apresentavam placas senis *post-mortem*. Este estudo também mostrou que 39% dos 279 indivíduos não diagnosticados com DA apresentavam níveis elevados de placas senis *post-mortem* (BEACH; MONSELL; PHILLIPS; KUKULL, 2012). Esses achados indicam a necessidade do entendimento molecular da DA, uma vez que a patologia relacionada a deposição de peptídeo β A não pode ser usada exclusivamente para confirmar o diagnóstico de DA, principalmente nos estágios iniciais da doença (BEACH; MONSELL; PHILLIPS; KUKULL, 2012; JANSEN; OSSENKOPPELE; KNOL; TIJMS *et al.*, 2015). Além disso, permanece controverso se essas lesões patológicas são as próprias causadoras da morte neuronal ou se são consequências de eventos moleculares que precedem a demência (DRACHMAN, 2014; GAUTHIER; ALBERT; FOX; GOEDERT *et al.*, 2016).

Por conseguinte, outros aspectos da DA tem sido investigados nos últimos anos como alvos para a melhoria terapêutica, como a relação desta patologia com a função e a integridade mitocondrial (CAI; TAMMINENI, 2017; SWERDLOW, 2018; SWERDLOW; BURNS; KHAN, 2010; 2014). As mitocôndrias são responsáveis por diversos processos essenciais no desenvolvimento e na manutenção do organismo. São organelas intracelulares cruciais em todas as células eucarióticas dependentes do metabolismo aeróbio, uma vez que são responsáveis pela produção de aproximadamente 95% da energia celular por meio do acoplamento da cadeia transportadora de elétrons (CTE) com o sistema de fosforilação oxidativa mitocondrial (OXPHOS, do inglês *oxidative phosphorylation*) (FRIEDMAN; NUNNARI, 2014). Além disso, as mitocôndrias contribuem para a manutenção da homeostase celular por participarem da regulação intracelular de cálcio, sinalização celular e regulação de processos, tais como a apoptose, diferenciação, crescimento e proliferação celular (FRIEDMAN; NUNNARI, 2014; RUGARLI; LANGER, 2012; ZHU; WANG; CHU, 2013).

As mitocôndrias são formadas por duas membranas compostas por bicamadas lipoprotéicas altamente especializadas, uma externa e uma interna. A membrana mitocondrial interna apresenta uma superfície pregueada designada de crista mitocondrial, sendo impermeável a quase todas as moléculas e contendo as

enzimas responsáveis pelo sistema de OXPHOS. As mitocôndrias possuem também o espaço intermembranar, cuja a composição iônica é semelhante a do citosol e contém proteínas envolvidas no transporte e regulação celular, tal como o citocromo *c*, e o espaço interno da matriz mitocondrial, onde as enzimas metabólicas e o DNA mitocondrial (mtDNA, do inglês *mitochondrial DNA*) estão contidas (FRIEDMAN; NUNNARI, 2014).

Para a formação do ATP mitocondrial, substratos energéticos, tais como a glicose, ácidos graxos e aminoácidos são degradados e os elétrons derivados predominantemente de intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA, do inglês *tricarboxylic acid cycle*) são doados para carreadores específicos, tais como o dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NAD⁺) e o dinucleotídeo de flavina-adenina (FAD) formando NADH e FADH₂. Em seguida, os elétrons do NADH e FADH₂ são transferidos para o complexo multienzimático do sistema de OXPHOS, o qual é um grupo de cinco complexos proteicos, resultando na redução do O₂ e formação de ATP (FRIEDMAN; NUNNARI, 2014; ZHU; WANG; CHU, 2013). De forma resumida, os elétrons derivados de NADH e FADH₂ são transferidos para o complexo I (NADH-desidrogenase) e II (succinato desidrogenase), que na sequência são oxidados resultando na redução da coenzima Q (CoQ). Por conseguinte, os elétrons da CoQ são transferidos para o complexo III (citocromo redutase) que, por sua vez, reduz o citocromo *c*. O complexo IV (citocromo *c* oxidase) catalisa a transferência de elétrons do citocromo *c* para o O₂, sendo este o aceptor final da CTE, levando a formação de H₂O. À medida que ocorre a passagem dos elétrons pelos complexos, prótons são bombeados da matriz para o espaço intermembranar mitocondrial, resultando em um potencial eletroquímico. A energia gerada neste gradiente é subsequentemente utilizada pelo complexo V (ATP-sintase) para gerar ATP a partir de difosfato de adenosina (ADP) e fosfato inorgânico (P_i). Logo, o ATP sintetizado na matriz mitocondrial é transportado para o citoplasma através de um translocador de nucleotídeos de adenina, também conhecido por translocador ATP/ADP (FRIEDMAN; NUNNARI, 2014; ZHU; WANG; CHU, 2013).

Embora este processo envolva a redução do O₂ à H₂O no sítio ativo do complexo IV, uma pequena porcentagem de O₂ não é completamente reduzida, dando origem a espécies reativas de oxigênio (EROs) que, em contrapartida, são neutralizados pelas defesas antioxidantes presentes na matriz mitocondrial, tais como a glutatona e a superóxido dismutase (FRIEDMAN; NUNNARI, 2014). No entanto, o

mau funcionamento do sistema de OXPHOS pode resultar na produção exacerbada de EROS e, uma vez que a capacidade antioxidante mitocondrial seja sobrecarregada pela presença de EROS, dano oxidativo e morte celular podem ocorrer (FRIEDMAN; NUNNARI, 2014; ONYANGO; KHAN; BENNETT, 2017). Além disso, os neurônios apresentam uma demanda energética excepcionalmente elevada de ATP, crucial para o transporte axonal, manutenção de gradientes iônicos, geração de potencial de membrana e transporte de vesículas sinápticas. Portanto, as mitocôndrias neuronais exercem importante função para a neuroplasticidade, regulação sinaptogênica e a homeostase neural por suprirem a demanda bioenergética do tecido neuronal. Desta forma, o comprometimento da função mitocondrial pode resultar em subunidades da CTE anômalas, prejudicando consequentemente a síntese de ATP. (CAI; TAMMINENI, 2017; ONYANGO; KHAN; BENNETT, 2017; RAEFSKY; MATTSON, 2017).

De fato, o declínio da função mitocondrial desempenha um importante papel nas doenças neurodegenerativas por comprometerem a atividade metabólica celular (CAI; TAMMINENI, 2017; FIVENSON; LAUTRUP; SUN; SCHEIBYE-KNUDSEN *et al.*, 2017; ONYANGO; KHAN; BENNETT, 2017). Nos últimos anos, várias linhas de pesquisa demonstraram defeitos no sistema bioenergético mitocondrial como um mecanismo patológico em doenças neurodegenerativas (CHOCRON; MUNKÁCSY; PICKERING, 2019; FIŠAR; HANSÍKOVÁ; KŘÍŽOVÁ; JIRÁK *et al.*, 2019; PEI; WALLACE, 2018; SWERDLOW, 2018). Além disso, a disfunção mitocondrial tem sido amplamente estudada na DA por influenciar no desencadeamento e aceleração do acúmulo e deposição de peptídeos β A e NFTs que, por sua vez, prejudicam ainda mais a integridade e função mitocondrial (CHOCRON; MUNKÁCSY; PICKERING, 2019; FIŠAR; JIRÁK; ZVĚŘOVÁ; SETNIČKA *et al.*, 2019; SWERDLOW, 2018; TYUMENTSEV; STEFANOVA; MURALEVA; RUMYANTSEVA *et al.*, 2018).

O comprometimento do metabolismo energético e da função mitocondrial têm sido demonstrado desde a década de 80, em estudos realizados em amostras de neocórtex de pacientes com demência (SIMS; FINEGAN; BLASS; BOWEN *et al.*, 1987) e mitocôndrias plaquetárias isoladas de pacientes com DA (PARKER; FILLEY; PARKS, 1990). Além disso, Blass e Gibson (1991) propuseram que o estresse metabólico devido ao comprometimento mitocondrial poderia contribuir para o acúmulo de placas senis e NFTs na DA (BLASS; GIBSON, 1991). Estudos *post-mortem* realizados em tecido hipocampal (SHENG; WANG; SU; LEE *et al.*, 2012) e

cortical (MANCZAK; CALKINS; REDDY, 2011) de pacientes diagnosticados com DA demonstraram dinâmica mitocondrial anômala com presença de fragmentação e demanda bioenergética prejudicada. Além disso, em estudos *in vitro* realizados em células embrionárias derivadas de camundongos Tg2576 para a DA demonstraram déficits funcionais precoces nas mitocôndrias sinápticas incluindo alteração da atividade de enzimas chaves, tais como o complexo IV da CTE e a piruvato desidrogenase (PDH), que são fundamentais para a produção de energia celular (QIN; LIU; COOPER; LIU *et al.*, 2002). Mais recentemente, estudos realizados em plaquetas coletadas a partir de sangue periférico de pacientes com DA revelaram parâmetros mitocondriais diminuídos relacionados à frequência respiratória basal, capacidade respiratória máxima e reserva respiratória e com concentrações plasmáticas médias inalteradas de A β ₄₂, A β ₄₀ ou A β ₄₂/A β ₄₀ (FIŠAR; JIRÁK; ZVĚŘOVÁ; SETNIČKA *et al.*, 2019). Além disso, atividades diminuídas de enzimas e complexos da CTE também foram demonstradas (FIŠAR; HANSÍKOVÁ; KŘÍŽOVÁ; JIRÁK *et al.*, 2019). Esses resultados corroboram a hipótese de que a disfunção mitocondrial pode contribuir para o desenvolvimento da DA (SWERDLOW, 2018; SWERDLOW; BURNS; KHAN, 2014).

Além do comprometimento da demanda bioenergética mitocondrial, a alteração da atividade da CTE gera um aumento na produção de EROs, resultando em populações neuronais vulneráveis ao estresse oxidativo evidenciados em pacientes com DA (MANCZAK; CALKINS; REDDY, 2011; MANCZAK; PARK; JUNG; REDDY, 2004; MAURER; ZIERZ; MÖLLER, 2000; SHENG; WANG; SU; LEE *et al.*, 2012) e em modelos animais para a DA (CALKINS; MANCZAK; MAO; SHIRENDEB *et al.*, 2011; QIN; LIU; COOPER; LIU *et al.*, 2002; STEFANOVA; MURALEVA; KORBOLINA; KISELEVA *et al.*, 2015; YAO; IRWIN; ZHAO; NILSEN *et al.*, 2009). EROs são contribuintes relevantes para patologias neurodegenerativas por possuírem potencial reatividade às biomoléculas, promovendo peroxidação lipídica e oxidação do DNA nuclear e do mtDNA, resultando em declínio funcional, senescência e apoptose celular (AGOSTINHO; CUNHA; OLIVEIRA, 2010; NUNOMURA; PERRY; ALIEV; HIRAI *et al.*, 2001; SCHAPIRA, 1996). Além disso, danos cumulativos no DNA nuclear e mtDNA interferem na função mitocondrial, acarretando em baixas taxas de produção de ATP, aumento da dependência da glicólise anaeróbia e, portanto, aumento da produção de EROs mitocondriais (SHENG; WANG; SU; LEE *et al.*, 2012; SWERDLOW; BURNS; KHAN, 2010; YAO; IRWIN; ZHAO; NILSEN *et al.*, 2009).

Decerto, o déficit da demanda metabólica mitocondrial seguido de danos oxidativos podem contribuir para o acúmulo do peptídeo β A e para a formação de placas senis por exacerbar a atividade dos complexos enzimáticos que participam do processamento da APP via amiloidogênica bem como, favorecer vias que propiciam a agregação dos oligômeros β A (NUNOMURA; PERRY; ALIEV; HIRAI *et al.*, 2001; REDDY; MANCZAK; MAO; CALKINS *et al.*, 2010; SWERDLOW; BURNS; KHAN, 2010; YAO; IRWIN; ZHAO; NILSEN *et al.*, 2009). Por conseguinte, o peptídeo β A ocasiona danos sinápticos e dendríticos, além de agregar-se aos compartimentos mitocondriais e prejudicar sua função desencadeando novamente a disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo (REDDY; MANCZAK; MAO; CALKINS *et al.*, 2010; SHENG; WANG; SU; LEE *et al.*, 2012; SWERDLOW; BURNS; KHAN, 2010).

1.4 Doença de Alzheimer e a biogênese mitocondrial

Uma característica importante do metabolismo energético cerebral é o forte acoplamento entre a demanda e o suprimento de energia. O cérebro é o órgão de maior demanda energética, representando apenas 2 a 3% do peso total do corpo, e consumindo mais de 20% da energia total produzida pelo organismo. Além disso, necessita de constante regulação da homeostase mitocondrial e da localização apropriada dessas organelas, nos distintos compartimentos subcelulares dos neurônios, para atender às necessidades metabólicas regionais em resposta à maior atividade neuronal (CHOCRON; MUNKÁCSY; PICKERING, 2019; UITTENBOGAARD; CHIARAMELLO, 2014). De fato, a função apropriada das mitocôndrias é fundamental para atender às necessidades fisiológicas das células neuronais. Logo, diversas vias participam da manutenção da integridade mitocondrial e/ou restauração adequada da função mitocondrial, incluindo a biogênese mitocondrial (GOLPICH; AMINI; MOHAMED; AZMAN ALI *et al.*, 2017; WU; PUIGSERVER; ANDERSSON; ZHANG *et al.*, 1999).

Biogênese mitocondrial é um processo pelo qual novas mitocôndrias são formadas por meio do crescimento e divisão de mitocôndrias pré-existentes nos compartimentos celulares (CALKINS; MANCZAK; MAO; SHIRENDEB *et al.*, 2011; ONYANGO; KHAN; BENNETT, 2017; RAEFSKY; MATTSON, 2017). Além disso, a biogênese mitocondrial participa do aumento do conteúdo mitocondrial por meio da

expressão de enzimas relacionadas à sua função, tais como as proteínas das membranas mitocondriais internas e externas e as proteínas constituintes da CTE (LI; HOU; HAO, 2017; UITTENBOGAARD; CHIARAMELLO, 2014; WU; PUIGSERVER; ANDERSSON; ZHANG *et al.*, 1999). Esse é um processo complexo uma vez que envolve a participação coordenada de dois genomas, o mitocondrial e o nuclear. A formação de complexos enzimáticos funcionais presentes na membrana mitocondrial interna depende da montagem sequencial das subunidades codificadas nuclearmente, seguida pela ligação das subunidades codificadas pelo mtDNA. Vale salientar que os genes nucleares contribuem com a expressão da maioria das subunidades respiratórias mitocondriais e das proteínas necessárias para a transcrição, tradução e replicação do mtDNA (LI; HOU; HAO, 2017; UITTENBOGAARD; CHIARAMELLO, 2014).

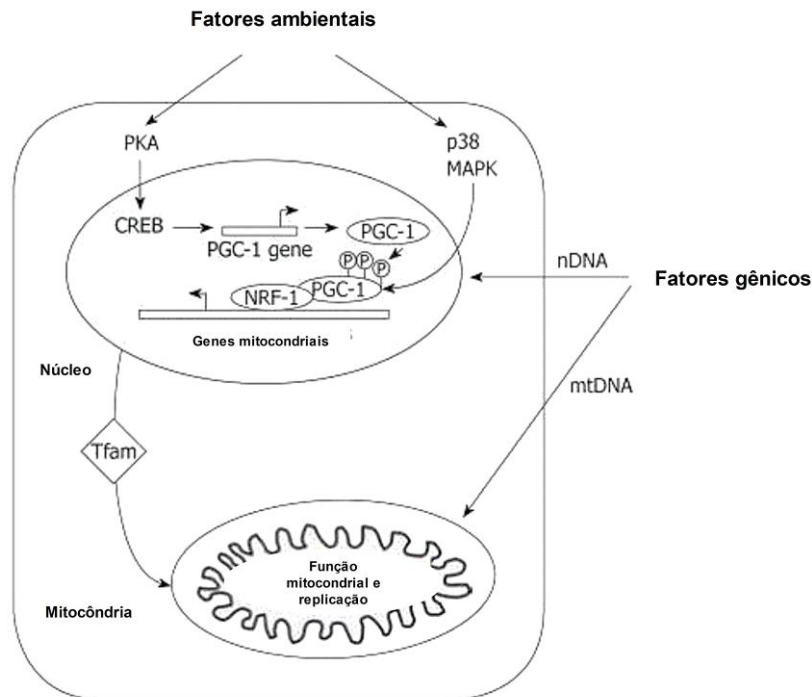
Originalmente identificado como coativador de transcrição induzido por receptores ativado por proliferadores de peroxissoma (PPAR, do inglês *peroxisome proliferator-activated receptor*), o coativador 1 α do receptor gama ativado pelo proliferador de peroxissoma (PGC-1 α , do inglês *proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha*) emergiu como um importante integrador de vias de sinalização no controle do metabolismo energético celular e sistêmico através da regulação de diversos processos metabólicos oxidativos e da biogênese mitocondrial (LIU; LIN, 2011; ONYANGO; KHAN; BENNETT, 2017; PALIKARAS; DASKALAKI; MARKAKI; TAVERNARAKIS, 2017; WU; PUIGSERVER; ANDERSSON; ZHANG *et al.*, 1999). PGC-1 α é expresso de forma ubíqua e participa da maioria dos aspectos da biogênese mitocondrial, incluindo a transcrição de genes da CTE acoplada ao sistema de OXPHOS, aumentando a densidade mitocondrial e a demanda respiratória mitocondrial (ONYANGO; KHAN; BENNETT, 2017; PALIKARAS; DASKALAKI; MARKAKI; TAVERNARAKIS, 2017).

Numerosos fatores, tais como hormônios (esteroides sexuais, hormônio do crescimento), neurotrofinas (BDNF), segundos mensageiros (cálcio, óxido nítrico, cAMP) e vias quinases (PKA, MAPK, SIRT1) atuam regulando a expressão de PGC-1 α em resposta adaptativa a mudanças fisiológicas e a estímulos patológicos (LIU; LIN, 2011; ONYANGO; KHAN; BENNETT, 2017). Sob respostas basais, o aumento dos níveis intracelulares da adenosina monofosfato cíclico (cAMP, do inglês *cyclic adenosine monophosphate*) resulta na estimulação da proteína quinase dependente de cAMP (PKA, do inglês *cAMP-dependent protein kinase*), conduzindo à dissociação

de sua subunidade catalítica (C α) da regulatória (R). A PKAC- α , ao migrar para o núcleo, gera a fosforilação dos resíduos da ser133 da proteína de ligação ao elemento responsivo ao cAMP (CREB, do inglês *cAMP response element-binding protein*), levando a sua ativação. O CREB fosforilado, liga-se ao sítio do elemento responsivo ao cAMP (KAUSHAL; LANGLOIS; DESJARDINS-CREPEAU; HAGGER *et al.*), presente na região promotora de diversos genes, e recruta a proteína de ligação ao CREB (CBP), que atua na maquinaria de transcrição basal, levando à transcrição do gene PGC-1 α (LIU; LIN, 2011; RAEFSKY; MATTSON, 2017).

Uma vez ativado pela fosforilação ou desacetilação, PGC-1 α ativa diferentes fatores transcricionais nucleares implicados no controle de múltiplas funções mitocondriais, tais como o fator respiratório nuclear 1 (NRF1, do inglês *nuclear respiratory factor 1*) e o fator respiratório nuclear 2 (NRF2, do inglês *nuclear respiratory factor 2*). Diante de diferentes demandas metabólicas celulares, NRF1 e NRF2 atuam controlando múltiplas funções mitocondriais, principalmente relacionadas ao metabolismo energético oxidativo por meio da ativação de regiões promotoras de genes nucleares que codificam as subunidades dos cinco complexos respiratórios (LI; HOU; HAO, 2017; UITTENBOGAARD; CHIARAMELLO, 2014). Além disso, ambos participam do mecanismo coordenado da expressão de genes envolvidos na expressão de importantes proteínas mitocondriais, incluindo o fator de transcrição mitocondrial A (TFAM, do inglês *mitochondrial transcription factor A*). O TFAM está envolvido em funções relevantes, tais como a transcrição, manutenção e replicação do mtDNA, bem como a transcrição de enzimas oxidativas cruciais para a conversão de piruvato em Acetil-CoA, tal como a subunidade E α do complexo piruvato desidrogenase (PDHE α , do inglês *pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha*) (LEONE; LEHMAN; FINCK; SCHAEFFER *et al.*, 2005; LI; HOU; HAO, 2017; RAEFSKY; MATTSON, 2017; WU; PUIGSERVER; ANDERSSON; ZHANG *et al.*, 1999). Portanto, através da regulação dos níveis de TFAM, o coativador PGC-1 α pode controlar a expressão de proteínas codificadas pelo mtDNA (UITTENBOGAARD; CHIARAMELLO, 2014). Desta forma, PGC-1 α participa na modulação de processos biológicos comumente envolvidos na plasticidade sináptica hipocampal, aprendizagem e memória e resistência ao estresse neuronal, por participar da biogênese mitocondrial e propiciar metabolismo energético (LIN; HANDSCHIN; SPIEGELMAN, 2005; LIU; LIN, 2011; RAEFSKY; MATTSON, 2017).

Figura 3. Biogênese mitocondrial



Biogênese mitocondrial. PKA fosforila os fatores de transcrição de ligação ao elemento de resposta ao cAMP (CREB), envolvidos na expressão do coativador 1 α do receptor gama ativado pelo proliferador de peroxissoma (PGC-1 α). PGC-1 α , interage com dois fatores-chave de transcrição nuclear, o fator respiratório nuclear 1 e 2 (NRF1 e NRF2). NRF1 e NRF2 induzem a expressão das subunidades dos cinco complexos mitocondriais da cadeia transportadora de elétrons (CTE) e ativam o fator de transcrição mitocondrial A (TFAM). TFAM posteriormente transloca-se para a mitocôndria e aumenta diretamente a transcrição e replicação do mtDNA. Adaptado de Reusens et al. (2011) (REUSENS; THEYS; REMACLE, 2011).

De fato, a biogênese mitocondrial é um importante sistema de controle da manutenção mitocondrial e é essencial para manter uma população mitocondrial funcional nos neurônios. Assim, o dano à biogênese mitocondrial pode desempenhar um papel importante nas doenças neurodegenerativas (UITTENBOGAARD; CHIARAMELLO, 2014). Em estudos realizados em camundongos *knockout* para PGC-1 α evidenciaram que o coativador é imprescindível para a expressão proteica necessária para as funções mitocondriais e funções metabólicas de múltiplos órgãos (LEONE; LEHMAN; FINCK; SCHAEFFER *et al.*, 2005; LIN; WU; TARR; LINDENBERG *et al.*, 2004), e a deleção do gene PGC-1 α conduz a defeitos no

sistema de OXPHOS limitando a resposta neuronal às demandas metabólicas resultando em neurodegeneração (CUI; JEONG; BOROVECKI; PARKHURST *et al.*, 2006; ST-PIERRE; DRORI; ULDRY; SILVAGGI *et al.*, 2006). Estudos também evidenciaram níveis reduzidos de PGC-1 α no cérebro de pacientes com DA (QIN; HAROUTUNIAN; KATSEL; CARDOZO *et al.*, 2009; SHENG; WANG; SU; LEE *et al.*, 2012) e em células M17 que superexpressam o gene da APP mutante (APP_{Swe}) (SHENG; WANG; SU; LEE *et al.*, 2012). Níveis reduzidos de PGC-1 α , NRF1, NRF2 e TFAM também foram evidenciados em camundongos transgênicos para o gene APP na idade de 12 meses (MANCZAK; KANDIMALLA; YIN; REDDY, 2018) e em linhagens celulares derivadas de células HT22 transfectadas com o gene mutado de APP (REDDY; YIN; MANCZAK; KUMAR *et al.*, 2018). Além disso, estudos demonstraram que a expressão reduzida de PGC-1 α pode contribuir para a geração patológica de peptídeo β A, levando à neurodegeneração na DA (CAMACHO; SERNEELS; SPITTAELS; MERCHIERS *et al.*, 2004; GONG; PAN; VEMPATI; ZHAO *et al.*, 2013).

De fato, PGC-1 α desempenha importante regulação da biogênese mitocondrial sendo crucial para o controle do dano celular associado à disfunção mitocondrial na DA. Embora estudos tenham demonstrado uma sinalização prejudicada da biogênese mitocondrial na DA, ainda não está claro quando essa sinalização se inicia na progressão da DA e até que ponto o comprometimento da biogênese mitocondrial mediada por PGC-1 α influencia a disfunção mitocondrial e as alterações comportamentais na DA. Logo, estudar a correlação entre a biogênese mitocondrial mediada por PGC-1 α e o desencadeamento da disfunção mitocondrial, bem como o fenótipo comportamental no modelo de camundongos 3xTg-AD para a DA contribuirá para a compreensão da patogênese, fornecendo novos biomarcadores que auxiliarão no diagnóstico precoce e no conhecimento para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

6 CONCLUSÃO

Utilizando o camundongo 3xTg-AD, pela primeira vez foi demonstrado que o comprometimento da biogênese mitocondrial mediada por PGC-1 α antecede a disfunção mitocondrial e este processo ocorre em uma idade que precede o desencadeamento da primeira característica histopatológica do modelo murino para a DA, podendo contribuir para as alterações nos comportamentos neuropsíquicos e cognitivos. Deste modo, podemos concluir que o comprometimento da biogênese mitocondrial pode ser o gatilho inicial para o desencadeamento e/ou facilitação do desenvolvimento dos principais marcadores da DA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

AGOSTINHO, P.; CUNHA, R. A.; OLIVEIRA, C. Neuroinflammation, oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Curr Pharm Des**, 16, n. 25, p. 2766-2778, 2010.

AHMED, M.; DAVIS, J.; AUCOIN, D.; SATO, T. *et al.* Structural conversion of neurotoxic amyloid-beta(1-42) oligomers to fibrils. **Nat Struct Mol Biol**, 17, n. 5, p. 561-567, May 2010.

AROSIO, P. Biophysical Aspects of Alzheimer's Disease: Implications for Pharmaceutical Sciences. **Pharm Res**, Sep 2017.

ASSOCIATION, A. S. 2015 Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimers Dement**, 11, n. 3, p. 332-384, Mar 2015.

BEACH, T. G.; MONSELL, S. E.; PHILLIPS, L. E.; KUKULL, W. Accuracy of the clinical diagnosis of Alzheimer disease at National Institute on Aging Alzheimer Disease Centers, 2005-2010. **J Neuropathol Exp Neurol**, 71, n. 4, p. 266-273, Apr 2012.

BELFIORE, R.; RODIN, A.; FERREIRA, E.; VELAZQUEZ, R. *et al.* Temporal and regional progression of Alzheimer's disease-like pathology in 3xTg-AD mice. **Aging Cell**, 18, n. 1, p. e12873, Feb 2019.

BLASS, J. P.; GIBSON, G. E. The role of oxidative abnormalities in the pathophysiology of Alzheimer's disease. **Rev Neurol (Paris)**, 147, n. 6-7, p. 513-525, 1991.

BRAAK, H.; BRAAK, E. Diagnostic criteria for neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging**, 18, n. 4 Suppl, p. S85-88, 1997 Jul-Aug 1997.

CAI, Q.; TAMMINENI, P. Mitochondrial Aspects of Synaptic Dysfunction in Alzheimer's Disease. **J Alzheimers Dis**, 57, n. 4, p. 1087-1103, 2017.

CALKINS, M. J.; MANCZAK, M.; MAO, P.; SHIRENDEB, U. *et al.* Impaired mitochondrial biogenesis, defective axonal transport of mitochondria, abnormal mitochondrial dynamics and synaptic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. **Hum Mol Genet**, 20, n. 23, p. 4515-4529, Dec 2011.

CAMACHO, I. E.; SERNEELS, L.; SPITTAELS, K.; MERCHIERS, P. *et al.* Peroxisome-proliferator-activated receptor gamma induces a clearance mechanism for the amyloid-beta peptide. **J Neurosci**, 24, n. 48, p. 10908-10917, Dec 2004.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NRB 6023: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.

CHOCRON, E. S.; MUNKÁCSY, E.; PICKERING, A. M. Cause or casualty: The role of mitochondrial DNA in aging and age-associated disease. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis**, 1865, n. 2, p. 285-297, Feb 2019.

CUI, L.; JEONG, H.; BOROVECKI, F.; PARKHURST, C. N. *et al.* Transcriptional repression of PGC-1alpha by mutant huntingtin leads to mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. **Cell**, 127, n. 1, p. 59-69, Oct 2006.

DENVER, P.; MCCLEAN, P. L. Distinguishing normal brain aging from the development of Alzheimer's disease: inflammation, insulin signaling and cognition. **Neural Regen Res**, 13, n. 10, p. 1719-1730, Oct 2018.

DRACHMAN, D. A. The amyloid hypothesis, time to move on: Amyloid is the downstream result, not cause, of Alzheimer's disease. **Alzheimers Dement**, 10, n. 3, p. 372-380, May 2014.

DUYCKAERTS, C.; POTIER, M. C.; DELATOUR, B. Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. **Acta Neuropathol**, 115, n. 1, p. 5-38, Jan 2008.

ESCOTT-PRICE, V.; BELLENGUEZ, C.; WANG, L. S.; CHOI, S. H. *et al.* Gene-wide analysis detects two new susceptibility genes for Alzheimer's disease. **PLoS One**, 9, n. 6, p. e94661, 2014.

FIVENSON, E. M.; LAUTRUP, S.; SUN, N.; SCHEIBYE-KNUDSEN, M. *et al.* Mitophagy in neurodegeneration and aging. **Neurochem Int**, Feb 2017.

FIŠAR, Z.; HANSÍKOVÁ, H.; KRÍŽOVÁ, J.; JIRÁK, R. *et al.* Activities of mitochondrial respiratory chain complexes in platelets of patients with Alzheimer's disease and depressive disorder. **Mitochondrion**, Aug 2019.

FIŠAR, Z.; JIRÁK, R.; ZVĚŘOVÁ, M.; SETNIČKA, V. *et al.* Plasma amyloid beta levels and platelet mitochondrial respiration in patients with Alzheimer's disease. **Clin Biochem**, Apr 2019.

FRANSQUET, P. D.; RYAN, J. The current status of blood epigenetic biomarkers for dementia. **Crit Rev Clin Lab Sci**, p. 1-23, Jul 2019.

FRIEDMAN, J. R.; NUNNARI, J. Mitochondrial form and function. **Nature**, 505, n. 7483, p. 335-343, Jan 2014.

GAUTHIER, S.; ALBERT, M.; FOX, N.; GOEDERT, M. *et al.* Why has therapy development for dementia failed in the last two decades? **Alzheimers Dement**, 12, n. 1, p. 60-64, Jan 2016.

GOLPICH, M.; AMINI, E.; MOHAMED, Z.; AZMAN ALI, R. *et al.* Mitochondrial Dysfunction and Biogenesis in Neurodegenerative diseases: Pathogenesis and Treatment. **CNS Neurosci Ther**, 23, n. 1, p. 5-22, Jan 2017.

GONG, B.; PAN, Y.; VEMPATI, P.; ZHAO, W. *et al.* Nicotinamide riboside restores cognition through an upregulation of proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α regulated β -secretase 1 degradation and mitochondrial gene expression in Alzheimer's mouse models. **Neurobiol Aging**, 34, n. 6, p. 1581-1588, Jun 2013.

GUNN-MOORE, D.; KAIDANOVICH-BEILIN, O.; GALLEGRO IRADI, M. C.; GUNN-MOORE, F. *et al.* Alzheimer's disease in humans and other animals-A consequence of postreproductive life span and longevity rather than aging. **Alzheimers Dement**, Sep 2017.

HAMPEL, H.; PRVULOVIC, D.; TEIPEL, S.; JESSEN, F. *et al.* The future of Alzheimer's disease: the next 10 years. **Prog Neurobiol**, 95, n. 4, p. 718-728, Dec 2011.

IQBAL, K.; ALONSO, A. E. C.; CHEN, S.; CHOCHAN, M. O. *et al.* Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. **Biochim Biophys Acta**, 1739, n. 2-3, p. 198-210, Jan 2005.

JACK, C. R.; LOWE, V. J.; WEIGAND, S. D.; WISTE, H. J. *et al.* Serial PIB and MRI in normal, mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: implications for sequence of pathological events in Alzheimer's disease. **Brain**, 132, n. Pt 5, p. 1355-1365, May 2009.

JANSEN, W. J.; OSSENKOPPELE, R.; KNOL, D. L.; TIJMS, B. M. *et al.* Prevalence of cerebral amyloid pathology in persons without dementia: a meta-analysis. **JAMA**, 313, n. 19, p. 1924-1938, May 2015.

JELLINGER, K. A.; JANETZKY, B.; ATTEMS, J.; KIENZL, E. Biomarkers for early diagnosis of Alzheimer disease: 'ALZheimer ASSociated gene'--a new blood biomarker? **J Cell Mol Med**, 12, n. 4, p. 1094-1117, Aug 2008.

KARRAN, E.; MERCKEN, M.; DE STROOPER, B. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. **Nat Rev Drug Discov**, 10, n. 9, p. 698-712, Aug 2011.

KAUSHAL, N.; LANGLOIS, F.; DESJARDINS-CREPEAU, L.; HAGGER, M. S. *et al.* Investigating dose-response effects of multimodal exercise programs on health-related quality of life in older adults. **Clin Interv Aging**, 14, p. 209-217, 2019.

LEONE, T. C.; LEHMAN, J. J.; FINCK, B. N.; SCHAEFFER, P. J. *et al.* PGC-1 α deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis. **PLoS Biol**, 3, n. 4, p. e101, Apr 2005.

LEVINE, M. E.; LU, A. T.; BENNETT, D. A.; HORVATH, S. Epigenetic age of the prefrontal cortex is associated with neuritic plaques, amyloid load, and Alzheimer's disease related cognitive functioning. **Aging (Albany NY)**, 7, n. 12, p. 1198-1211, Dec 2015.

LI, P. A.; HOU, X.; HAO, S. Mitochondrial biogenesis in neurodegeneration. **J Neurosci Res**, 95, n. 10, p. 2025-2029, 10 2017.

LIN, J.; HANDSCHIN, C.; SPIEGELMAN, B. M. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. **Cell Metab**, 1, n. 6, p. 361-370, Jun 2005.

LIN, J.; WU, P. H.; TARR, P. T.; LINDENBERG, K. S. *et al.* Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1alpha null mice. **Cell**, 119, n. 1, p. 121-135, Oct 2004.

LIU, C.; LIN, J. D. PGC-1 coactivators in the control of energy metabolism. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)**, 43, n. 4, p. 248-257, Apr 2011.

MANCZAK, M.; CALKINS, M. J.; REDDY, P. H. Impaired mitochondrial dynamics and abnormal interaction of amyloid beta with mitochondrial protein Drp1 in neurons from patients with Alzheimer's disease: implications for neuronal damage. **Hum Mol Genet**, 20, n. 13, p. 2495-2509, Jul 2011.

MANCZAK, M.; KANDIMALLA, R.; YIN, X.; REDDY, P. H. Hippocampal mutant APP and amyloid beta-induced cognitive decline, dendritic spine loss, defective autophagy, mitophagy and mitochondrial abnormalities in a mouse model of Alzheimer's disease. **Hum Mol Genet**, 27, n. 8, p. 1332-1342, 04 2018.

MANCZAK, M.; PARK, B. S.; JUNG, Y.; REDDY, P. H. Differential expression of oxidative phosphorylation genes in patients with Alzheimer's disease: implications for early mitochondrial dysfunction and oxidative damage. **Neuromolecular Med**, 5, n. 2, p. 147-162, 2004.

MAURER, I.; ZIERZ, S.; MÖLLER, H. J. A selective defect of cytochrome c oxidase is present in brain of Alzheimer disease patients. **Neurobiol Aging**, 21, n. 3, p. 455-462, 2000 May-Jun 2000.

MCKHANN, G.; DRACHMAN, D.; FOLSTEIN, M.; KATZMAN, R. *et al.* 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**, 34, n. 7, p. 939-944, Jul 1984.

MEZ, J.; MARDEN, J. R.; MUKHERJEE, S.; WALTER, S. *et al.* Alzheimer's disease genetic risk variants beyond APOE ϵ 4 predict mortality. **Alzheimers Dement (Amst)**, 8, p. 188-195, 2017.

NUNOMURA, A.; PERRY, G.; ALIEV, G.; HIRAI, K. *et al.* Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. **J Neuropathol Exp Neurol**, 60, n. 8, p. 759-767, Aug 2001.

ODDO, S.; CACCAMO, A.; KITAZAWA, M.; TSENG, B. P. *et al.* Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging**, 24, n. 8, p. 1063-1070, Dec 2003.

ODDO, S.; CACCAMO, A.; SHEPHERD, J. D.; MURPHY, M. P. *et al.* Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. **Neuron**, 39, n. 3, p. 409-421, Jul 2003.

ONYANGO, I. G.; KHAN, S. M.; BENNETT, J. P. Mitochondria in the pathophysiology of Alzheimer's and Parkinson's diseases. **Front Biosci (Landmark Ed)**, 22, p. 854-872, Jan 2017.

PALIKARAS, K.; DASKALAKI, I.; MARKAKI, M.; TAVERNARAKIS, N. Mitophagy and age-related pathologies: Development of new therapeutics by targeting mitochondrial turnover. **Pharmacol Ther**, 178, p. 157-174, Oct 2017.

PANZA, F.; LOZUPONE, M.; LOGROSCINO, G.; IMBIMBO, B. P. A critical appraisal of amyloid- β -targeting therapies for Alzheimer disease. **Nat Rev Neurol**, 15, n. 2, p. 73-88, Feb 2019.

PARKER, W. D.; FILLEY, C. M.; PARKS, J. K. Cytochrome oxidase deficiency in Alzheimer's disease. **Neurology**, 40, n. 8, p. 1302-1303, Aug 1990.

PEI, L.; WALLACE, D. C. Mitochondrial Etiology of Neuropsychiatric Disorders. **Biol Psychiatry**, 83, n. 9, p. 722-730, 05 2018.

QIN, L.; LIU, Y.; COOPER, C.; LIU, B. *et al.* Microglia enhance beta-amyloid peptide-induced toxicity in cortical and mesencephalic neurons by producing reactive oxygen species. **J Neurochem**, 83, n. 4, p. 973-983, Nov 2002.

QIN, W.; HAROUTUNIAN, V.; KATSEL, P.; CARDOZO, C. P. *et al.* PGC-1 α expression decreases in the Alzheimer disease brain as a function of dementia. **Arch Neurol**, 66, n. 3, p. 352-361, Mar 2009.

QUERFURTH, H. W.; LAFERLA, F. M. Alzheimer's disease. **N Engl J Med**, 362, n. 4, p. 329-344, Jan 2010.

RAEFSKY, S. M.; MATTSON, M. P. Adaptive responses of neuronal mitochondria to bioenergetic challenges: Roles in neuroplasticity and disease resistance. **Free Radic Biol Med**, 102, p. 203-216, Jan 2017.

REDDY, P. H.; MANCZAK, M.; MAO, P.; CALKINS, M. J. *et al.* Amyloid-beta and mitochondria in aging and Alzheimer's disease: implications for synaptic damage and cognitive decline. **J Alzheimers Dis**, 20 Suppl 2, p. S499-512, 2010.

REDDY, P. H.; YIN, X.; MANCZAK, M.; KUMAR, S. *et al.* Mutant APP and amyloid beta-induced defective autophagy, mitophagy, mitochondrial structural and functional changes and synaptic damage in hippocampal neurons from Alzheimer's disease. **Hum Mol Genet**, 27, n. 14, p. 2502-2516, 07 2018.

REITZ, C.; BRAYNE, C.; MAYEUX, R. Epidemiology of Alzheimer disease. **Nat Rev Neurol**, 7, n. 3, p. 137-152, Mar 2011.

REUSENS, B.; THEYS, N.; REMACLE, C. Alteration of mitochondrial function in adult rat offspring of malnourished dams. **World J Diabetes**, 2, n. 9, p. 149-157, Sep 2011.

RUGARLI, E. I.; LANGER, T. Mitochondrial quality control: a matter of life and death for neurons. **EMBO J**, 31, n. 6, p. 1336-1349, Mar 2012.

RYAN, J.; FRANSQUET, P.; WRIGGLESWORTH, J.; LACAZE, P. Phenotypic Heterogeneity in Dementia: A Challenge for Epidemiology and Biomarker Studies. **Front Public Health**, 6, p. 181, 2018.

SCHAPIRA, A. H. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegeneration. **Curr Opin Neurol**, 9, n. 4, p. 260-264, Aug 1996.

SCHEUNER, D.; ECKMAN, C.; JENSEN, M.; SONG, X. *et al.* Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. **Nat Med**, 2, n. 8, p. 864-870, Aug 1996.

SELKOE, D. J. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. **Physiol Rev**, 81, n. 2, p. 741-766, Apr 2001.

SHENG, B.; WANG, X.; SU, B.; LEE, H. G. *et al.* Impaired mitochondrial biogenesis contributes to mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. **J Neurochem**, 120, n. 3, p. 419-429, Feb 2012.

SIMS, N. R.; FINEGAN, J. M.; BLASS, J. P.; BOWEN, D. M. *et al.* Mitochondrial function in brain tissue in primary degenerative dementia. **Brain Res**, 436, n. 1, p. 30-38, Dec 1987.

ST-PIERRE, J.; DRORI, S.; ULDRY, M.; SILVAGGI, J. M. *et al.* Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. **Cell**, 127, n. 2, p. 397-408, Oct 20 2006.

STEFANOVA, N. A.; MURALEVA, N. A.; KORBOLINA, E. E.; KISELEVA, E. *et al.* Amyloid accumulation is a late event in sporadic Alzheimer's disease-like pathology in nontransgenic rats. **Oncotarget**, 6, n. 3, p. 1396-1413, Jan 2015.

SWERDLOW, R. H. Mitochondria and Mitochondrial Cascades in Alzheimer's Disease. **J Alzheimers Dis**, 62, n. 3, p. 1403-1416, 2018.

SWERDLOW, R. H.; BURNS, J. M.; KHAN, S. M. The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis. **J Alzheimers Dis**, 20 Suppl 2, p. S265-279, 2010.

SWERDLOW, R. H.; BURNS, J. M.; KHAN, S. M. The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: progress and perspectives. **Biochim Biophys Acta**, 1842, n. 8, p. 1219-1231, Aug 2014.

TERRY, R. D.; MASLIAH, E.; SALMON, D. P.; BUTTERS, N. *et al.* Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. **Ann Neurol**, 30, n. 4, p. 572-580, Oct 1991.

TYUMENTSEV, M. A.; STEFANOVA, N. A.; MURALEVA, N. A.; RUMYANTSEVA, Y. V. *et al.* Mitochondrial Dysfunction as a Predictor and Driver of Alzheimer's Disease-Like Pathology in OXYS Rats. **J Alzheimers Dis**, 63, n. 3, p. 1075-1088, 2018.

UITTENBOGAARD, M.; CHIARAMELLO, A. Mitochondrial biogenesis: a therapeutic target for neurodevelopmental disorders and neurodegenerative diseases. **Curr Pharm Des**, 20, n. 35, p. 5574-5593, 2014.

WU, Z.; PUIGSERVER, P.; ANDERSSON, U.; ZHANG, C. *et al.* Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. **Cell**, 98, n. 1, p. 115-124, Jul 1999.

YAO, J.; IRWIN, R. W.; ZHAO, L.; NILSEN, J. *et al.* Mitochondrial bioenergetic deficit precedes Alzheimer's pathology in female mouse model of Alzheimer's disease. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 106, n. 34, p. 14670-14675, Aug 2009.

ZHU, J.; WANG, K. Z.; CHU, C. T. After the banquet: mitochondrial biogenesis, mitophagy, and cell survival. **Autophagy**, 9, n. 11, p. 1663-1676, Nov 2013.