



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIAS
DA VIDA E DA NATUREZA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOCÊNCIAS**

**INVESTIGAÇÃO DE MARCADORES BIOQUÍMICOS NO ENVELHECIMENTO
BIOLÓGICO E NO DESENVOLVIMENTO DE DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS**

MARCELA RODRIGUES LIMA

Foz do Iguaçu
2020



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIAS
DA VIDA E DA NATUREZA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOCÊNCIAS**

**INVESTIGAÇÃO DE MARCADORES BIOQUÍMICOS NO ENVELHECIMENTO
BIOLÓGICO E NO DESENVOLVIMENTO DE DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS**

MARCELA RODRIGUES LIMA

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Cezar Rangel Pestana

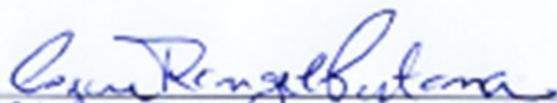
Foz do Iguaçu
2020

MARCELA RODRIGUES LIMA

**INVESTIGAÇÃO DE MARCADORES BIOQUÍMICOS NO
ENVELHECIMENTO BIOLÓGICO E NO DESENVOLVIMENTO DE
DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração Biociências.

BANCA EXAMINADORA



Orientador: Prof. Dr. Cezar Rangel Pestana
UNILA



Prof. Dr. Adriane Cristina Guerino
UNIAMÉRICA



Prof. Dr. Seidel Guerra Lopez
UNILA

Catálogo elaborado pelo Setor de Tratamento da Informação
Catálogo de Publicação na Fonte. UNILA - BIBLIOTECA LATINO-AMERICANA - PT

L732

Lima, Marcela Rodrigues.

Investigação de marcadores bioquímicos no envelhecimento biológico e no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas / Marcela Rodrigues Lima. - Foz do Iguaçu-PR, 2020.

62 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Integração Latino-Americana. Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza. Pós-Graduação em Biociências. Foz do Iguaçu-PR, 2022.

Orientador: Cezar Rangel Pestana.

1. Neurodegeneração. 2. Envelhecimento. 3. Hipercolesterolemia. I. Pestana, Cezar Rangel. II. Título.

CDU 616.8:577.12

Dedico este trabalho aos meus avós, que me instigaram a contribuir para a ciência que tenta entender e explicar o fascinante, belo e, eventualmente, doloroso ciclo da vida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Cezar, pela oportunidade de desenvolver esse trabalho. Por ter aceitado iniciar esse projeto mesmo morando em outro país quando eu fiz questão de ser orientada por ele. Por ter sido paciente e compreensivo nos momentos difíceis, que não foram raros. Por ter sido firme e exigente quando necessário (também não foram poucas vezes). Por me guiar nos primeiros passos na pós-graduação de uma forma tão admirável. Por ter sempre confiado em mim, mais que eu mesma, serei eternamente grata.

Aos meus pais, que nunca mediram esforços pra me levar além. Por terem me apoiado em todas as etapas da minha vida, nas minhas escolhas certas ou erradas. Por fazerem tudo o quanto puderam ao longo de toda minha vida pra que eu pudesse viver esse momento. Agradecer nunca será suficiente. Esse título também é de vocês.

Ao Luiz, meu marido, por entender, acolher e dividir comigo as responsabilidades da minha escolha. Por ter me acalmado quando o medo foi maior. Por ter me incentivado quando a vontade era desistir. Por estar ao meu lado incondicionalmente mantendo a minha fé e me fazendo acreditar que eu concluiria essa difícil e gratificante etapa da minha vida profissional, pessoal e acadêmica.

Aos meus sogros, por terem estado sempre prontos para tornar essa caminhada mais agradável, seja com uma conversa, um bolo, um café, um almoço, ou tentando me tirar de dentro de casa, da frente do computador, num dia bonito de sol. Tudo o que fizeram por mim fez muita diferença.

À Julia e ao Vinícius, por terem sido as principais pessoas a quem eu pude recorrer nos momentos mais difíceis, passando horas me ajudando sem pedir nada em troca. Por terem se doado generosamente quando me machuquei e precisei de ajuda para simplesmente tudo, sem se importar com a hora, a distância, o peso, a sujeira, o calor, o cansaço, o sono e as dificuldades. Sem dúvidas, esse trabalho não teria sido concluído sem esse amparo. Meus mais sinceros e profundos agradecimentos.

Aos meus amigos de mestrado Allysson, Gabriel e Maria Lucía, por estarem presentes em todos os momentos desde o início. Por terem sido parceiros de

estudos, de cerveja, de churrasco, de desespero e de alegria e, assim, terem tornado essa jornada muito melhor. Vencemos juntos.

Aos professores, Francisney, Seidel, Gleisson, Thiago, Maria Cláudia, Danúbia, Jorge, Maria Leandra, Carla, Carlos e Pablo por dividirem seus conhecimentos que transcendem o limite da universidade. Por transmitirem suas paixões, alegrias, dificuldades e realizações trazidas pela academia e pela ciência. Raramente temos a oportunidade de nos deparar com professores como vocês, que dominam a arte de ensinar de uma forma indescritível. Foi um prazer aprender com vocês.

Ao Laboratório Master Lab e ao Lar dos Idosos, por terem me recebido de portas abertas desde o primeiro contato. Em especial, agradeço à D. Edna, ao Sr. Pedro e ao Marcos por me fornecerem todo o suporte para o desenvolvimento desse projeto de forma integral e irrestrita. A parceria e a confiança depositada em nós foram cruciais para o resultado que tivemos.

A todos que de alguma forma contribuíram para esse momento, minha eterna gratidão.

LIMA, Marcela Rodrigues; PESTANA, Cezar Rangel. **Investigação de marcadores bioquímicos no envelhecimento biológico e no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas**. p.62. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biociências – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2020.

RESUMO

O envelhecimento biológico é caracterizado pela perda progressiva da capacidade de manter a homeostase. A relação entre o envelhecimento e a manifestação de doenças neurodegenerativas como a Esclerose Lateral Amiotrófica, Doença de Huntington, Doença de Parkinson e Alzheimer pode ser investigada por meio de marcadores bioquímicos como uma abordagem alternativa e pouco invasiva na identificação de alterações fisiológicas decorrentes do avanço da idade. Este estudo é uma análise transversal para identificação de marcadores bioquímicos envolvidos com o envelhecimento e sua potencial relevância para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. Uma análise retrospectiva foi realizada para determinar a evolução de potenciais marcadores bioquímicos ligados ao envelhecimento a partir de um banco de dados de amostras clínicas. Em seguida, 100 (cem) voluntários foram selecionados de acordo com os critérios de inclusão e exclusão e divididos em grupos formados por adultos com idade entre 20 e 59 anos e idosos com idade acima de 60 anos. Os voluntários foram submetidos a testes de função cognitiva e motora. Posteriormente, amostras de sangue periférico foram coletadas para a determinação de marcadores bioquímicos de perfil lipídico e estresse oxidativo. Os testes cognitivo e motor revelaram um declínio progressivo no desempenho cognitivo e motor dos voluntários com o avanço da idade. Diferenças significativas foram observadas entre o perfil lipídico de adultos e idosos, como aumento do colesterol total, lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) e triglicérides, bem como diminuição da lipoproteína de alta densidade (HDL) nos voluntários idosos em relação aos adultos. Além disso, os valores de metais traços relevantes para a defesa antioxidante como ferro, selênio e manganês foram menores em idosos em relação aos adultos. Os valores obtidos nos testes motor e cognitivo foram menores em idosos quando comparados com voluntários, sendo que os níveis de selênio e manganês foram menores em voluntários com algum tipo de doença neurodegenerativa previamente diagnosticada como doença de Parkinson e Alzheimer. Diferenças significativas foram observadas no perfil lipídico e metais traços entre voluntários adultos e idosos, bem como entre voluntários idosos com diferentes níveis de comprometimento. Marcadores bioquímicos vêm sendo investigados como ferramenta para o diagnóstico precoce do declínio cognitivo e motor durante o envelhecimento. Alterações no perfil lipídico e estado oxidativo podem estar associados a doenças neurodegenerativas como consequência da perda da homeostasia celular. Os resultados obtidos podem contribuir para a aplicação de marcadores bioquímicos no diagnóstico e tratamento de doenças relacionadas ao envelhecimento.

Palavras-chave: Neurodegeneração. Envelhecimento. Hipercolesterolemia. Metais traços. Enzimas antioxidantes.

LIMA, Marcela Rodrigues; PESTANA, Cezar Rangel. **Investigation of biological markers in aging and development of neurodegenerative diseases**. p.62. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biociências – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2020.

ABSTRACT

Aging is a common hallmark of all living organisms and occurs as a progressive loss of cell homeostasis. It is known that aging is associated with neurodegenerative diseases such as Amyotrophic Lateral Sclerosis, Huntington's Disease, Parkinson's Disease and Alzheimer's Disease. The investigation of peripheral biomarkers is a low invasive alternative approach for tracking changes in physiological state and systemic alterations in metabolism and immune response with age. This study is cross-sectional analysis aimed to determine biomarkers involved with aging and its potential relevance to neurodegenerative diseases. A previous retrospective analysis was performed to determine aging biomarkers from a clinical sample database. Next, one hundred volunteers were selected according to inclusion and exclusion criteria, which consisted of 50 adults with age between 20 and 59 years and 50 elderlies with age over 60 years. By signing the TCLE, all were submitted to cognitive function MEEM and motor function tests through part III of the UPDRS. Subsequently, peripheral blood samples were collected for the determination of markers associated with the lipid profile and oxidative stress including enzymes and trace metals. Lipid biomarkers profile showed an increase in Total Cholesterol, Low Density Lipoproteins Cholesterol (LDL), Very Low Density Lipoproteins Cholesterol (VLDL) and triglycerides as well as a decrease in High Density Lipoproteins Cholesterol (HDL) in elderlies when compared to adults. It was also observed a decrease of trace metals important to antioxidant defense such as iron, selenium and manganese particularly in elderly in relation to adult volunteers. Thus, the values found in the elderly volunteers with poor motor and cognitive test scores were lower compared to elderly volunteers with normal scores. Interestingly, lower levels of selenium and manganese were observed in elderly volunteers with some type of neurodegeneration impairment like Parkinson's and Alzheimer's diseases, whereas manganese correlated to cognitive decline. Metabolic markers are described as one of the main risk factors for cognitive decline. Changes in the lipid profile are related to the pathophysiology of neurodegeneration as well as alterations in the cellular oxidative status. There are multiple simultaneous changes in lipid and metals serum biomarkers during age with potential implication to cellular physiology. These findings may contribute to the understanding how biomarkers can be used for the diagnosis and treatment of aging-related diseases.

Key words: Neurodegeneration. Aging. Hypercholesterolemia. Traces metals. Antioxidant enzymes.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Detalhamento analítico.....	27
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Relação entre comprometimento cognitivo e motor com relação à idade	34
Figura 2 – Variação no perfil lipídico de acordo com a faixa etária.....	36
Figura 3 – Variação da concentração sérica de metais de acordo com a faixa etária	38
Figura 4 – Variação na concentração sérica de colesterol HDL (A) e selênio (B) de acordo com o nível de comprometimento por faixa etária	39
Figura 5 – Variação na concentração sérica de manganês de acordo com o nível de comprometimento por faixa etária (A) e com o tipo de comprometimento (B)	40
Figura 6 – Variação na concentração sérica de marcadores bioquímicos com relação à idade e ao nível de comprometimento.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APP – Proteína Precursora Amiloide

CTA – Capacidade Antioxidante Total

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

ERO's – Espécies Reativas de Oxigênio

HDL – Lipoproteínas de Alta Densidade

IBGE – Instituto de Geografia e Estatística

LDL – Lipoproteínas de Baixa Densidade

MEEM – Mini-Exame do Estado Mental

OMS – Organização Mundial da Saúde

RNA – Ácido Ribonucleico

SOD – Superóxido Dismutase

UPDRS - Unified Parkinson Disease Rating Scale

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

VLDL – Lipoproteínas de Muito Baixa Densidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO	14
1.1.1 Envelhecimento biológico.....	14
1.1.2 Aspectos biológicos do envelhecimento.....	15
1.1.3 Neurodegeneração	16
1.1.4 Marcadores bioquímicos	17
1.2 JUSTIFICATIVA.....	19
2 OBJETIVOS	20
2.1 GERAL	20
2.2 ESPECÍFICOS	20
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 PRIMEIRA ETAPA: ANÁLISE RETROSPECTIVA DE MARCADORES BIOQUÍMICOS SÉRICOS.....	21
3.1.1 Tratamento dos dados.....	21
3.2 SEGUNDA ETAPA: AVALIAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL DOS GRUPOS	21
3.2.1 Amostra.....	21
3.2.2 Considerações Éticas	22
3.2.3 Procedimentos da pesquisa	22
3.2.3.1 Avaliação clínica e laboratorial dos grupos.....	22
3.2.4 Instrumentos	23
3.2.4.1 Avaliação clínica geral.....	23
3.2.4.2 Mini Exame do Estado Mental (MEEM)	23
3.2.4.3 Unified Parkinson Disease Rating Scale (MDS-UPDRS).....	23
3.2.5 Coleta e armazenamento de material biológico	24
3.2.6 Doseamento de marcadores bioquímicos.....	24
3.2.6.1 Dosagens terceirizadas	24
3.2.6.2 Dosagem de colesterol total.....	25
3.2.6.3 Dosagem de colesterol HDL	26
3.2.6.4 Dosagem de triglicerídeos.....	26
3.2.6.5 Avaliação da Capacidade Antioxidante Total (CTA)	27

3.7 TRATAMENTO DOS DADOS	28
3.8 GERENCIAMENTO DE DADOS DA PESQUISA	29
4 RESULTADOS	30
5 DISCUSSÃO	40
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
7 REFERÊNCIAS.....	45
APÊNDICE A	49
ANEXO A	50
ANEXO B	53
ANEXO C	55
ANEXO D	59
ANEXO E	62

1 INTRODUÇÃO

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 Envelhecimento biológico

O envelhecimento é um processo inerente aos seres vivos, resultado do declínio progressivo das funções fisiológicas e falhas em mecanismos de homeostasia celular (FECHINE; TROMPIERI, 2012). O avanço da idade está associado ao aumento do risco de doenças neurodegenerativas, e que se manifestam mais claramente a partir da quarta década de vida (LEITE et al., 2012).

Os critérios de classificação quanto ao envelhecimento e à população idosa mudaram muito ao longo do tempo, principalmente devido ao aumento da expectativa de vida ao longo dos anos. Entre as décadas de 1940 a 2008, a expectativa de vida no Brasil aumentou em mais de 30 anos, passando de 40,5 anos para 73 anos. Segundo a Tabela de Mortalidade publicada em 2017 pelo Instituto de Geografia e Estatística (IBGE), a expectativa de vida no país é de 75,5 anos. Em análise prospectiva, em 2050 a expectativa de vida será de 81,3 anos, quando a população idosa pode superar a população jovem (IBGE, 2017).

Em 2032, o Brasil será considerado um país envelhecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (classificação para países com 14% da população com mais de 65 anos) com cerca de 32,5 milhões de idosos dentre mais de 226 milhões de brasileiros (OMS, 2019). Acredita-se que esse fenômeno seja resultado da redução do índice de mortalidade infantil e do avanço da medicina com novas alternativas terapêuticas e métodos de diagnóstico precoces de muitas doenças (ESQUENAZI, 2008).

Na atualidade, a OMS classifica como idoso o indivíduo com 60 anos de idade ou mais para países em desenvolvimento. No Brasil, a população idosa atual divide-se em 57% mulheres e 43% homens (AGONDI et al., 2012).

1.1.2 Aspectos biológicos do envelhecimento

As circunstâncias que conduzem ao processo do envelhecimento são multifatoriais, sendo, possivelmente o resultado de uma combinação entre fatores genéticos e fatores externos que influenciam o aparecimento de doenças no curso de vida (PEREIRA, 2015).

Duas das teorias mais aceitas descrevem o envelhecimento programado, que sustenta a hipótese de um prazo pré-determinado para o ciclo da vida (nascimento, crescimento, maturidade, senescência e morte) através da ativação e inativação de certos genes, e a do envelhecimento estocástico que sugere a ocorrência de danos moleculares e celulares aleatórios e progressivos que ocorrem com o avanço da idade e se manifestam como agravos a saúde (WEINERT; TIMIRAS, 2003).

A teoria do envelhecimento estocástico consiste num grupo de várias hipóteses, como a teoria do *inflammaging*, da imunossenescência, das alterações genéticas, como o encurtamento dos telômeros, e do estresse oxidativo. Somados às teorias supracitadas, outros fatores estão intimamente relacionados ao envelhecimento como a qualidade de vida que inclui hábitos alimentares, higiene e estresse emocional, dentre outras variáveis a que o homem estará exposto (PEREIRA, 2015).

As teorias de alteração genética e epigenética sugerem que as doenças relacionadas ao envelhecimento se baseiam no acúmulo de mutações causadas por diversos agentes exógenos e endógenos, tanto no DNA nuclear como mitocondrial, agravado pela progressiva perda da capacidade dos sistemas de reparo celular, bem como sua própria capacidade de replicação (FRANCESCHI; CAMPISI, 2014). Além disso, algumas regiões cromossômicas importantes para a estabilidade genômica são mais comprometidas, como a região dos telômeros (TEIXEIRA; GUARIENTO, 2010). Os telômeros são sequências repetidas de nucleotídeos nas extremidades dos DNA, e que protegem as regiões codificantes dos genomas durante as replicações, evitando o encurtamento dos cromossomos. Dessa forma, o comprimento dos telômeros determina o número máximo de replicações de uma célula até atingir a “senescência replicativa”, momento conhecido como limite de Hayflick (TEIXEIRA; GUARIENTO, 2010).

A hipótese do estresse oxidativo, estabelecida inicialmente em 1956 por Denham Harman, atribui os danos celulares às espécies reativas de oxigênio (EROs).

Esses compostos são gerados fisiologicamente por processos metabólicos, principalmente pelas mitocôndrias através da fosforilação oxidativa para geração de energia e podem causar prejuízos à função celular. Para neutralizar os efeitos deletérios das EROs, as células dispõem de sistemas antioxidantes, que com o envelhecimento estão diminuídos gerando o desequilíbrio entre os componentes oxidantes e antioxidantes chamado estresse oxidativo. O nível do estresse oxidativo pode ser avaliado de diversas formas, como o nível de oxidação proteica, oxidação lipídica (MAD) e a capacidade antioxidante total (CAT) que é a soma de todos os componentes antioxidantes ativos no sistema. (TEIXEIRA; GUARIENTO, 2010). De fato, a integridade das mitocôndrias diminui com a idade, bem como seu DNA se torna mais sensível aos danos gerados pelo estresse oxidativo (FECHINE; TROMPIERI, 2012).

1.1.3 Neurodegeneração

O sistema nervoso é composto por uma grande variedade de células (neurônios e células gliais) que possuem propriedades morfológicas e funcionais específicas. De forma heterogênea, formam um conjunto de redes de comunicação características a cada sistema neural e são extremamente sensíveis a quaisquer alterações de homeostasia (VERHEIJEN; VERMULST; LEEUWEN, 2018).

A neurodegeneração é caracterizada pela morte de células do sistema nervoso, sendo que as alterações celulares observadas durante o envelhecimento incluem aumento de danos no DNA neuronal, aumento de estresse oxidativo, acúmulo de constituintes tóxicos e neuro-inflamação crônica (OLIVEIRA, 2013).

Análises pós-morte de encéfalos de pacientes com doenças neurodegenerativas relacionadas principalmente ao corpo celular do neurônio, como Doença de Huntington, Doença de Parkinson, Doença de Alzheimer e Esclerose Lateral Amiotrófica, identificaram formas tóxicas da proteína Tau associada à formação e estabilização de microtúbulos geradas por hiperfosforilação. De fato, o grau de fosforilação de Tau é essencial para a homeostase celular e pode resultar na formação de emaranhados neurofibrilares que se acumulam e interferem nas sinapses levando ao declínio cognitivo e/ou motor (MAXAN; CICCETTI, 2018). A deposição de placas beta-amiloides em regiões específicas do cérebro também está ligada a neurodegeneração,

resultado de clivagens proteolíticas sequenciais da proteína precursora amiloide (APP), um constituinte de membrana de regiões sinápticas (METAXAKIS; PLOUMI; TAVERNARAKIS, 2018). A alfa-sinucleína também tem a capacidade de formar agregados filamentosos intracelulares que compõem inclusões proteicas chamadas corpos de Lewy (PERFEITO; REGO, 2012).

O estresse oxidativo modifica a estrutura celular de membranas, organelas e DNA. A presença dos aglomerados proteicos supracitados também promove o aumento do estresse oxidativo que causará interferência na homeostase de neurônios, micróglia e astrócitos, de forma que os danos se tornam mais intensos num processo de retroalimentação (WEINSTEIN, 2018).

1.1.4 Marcadores bioquímicos

A identificação de marcadores bioquímicos circulantes é uma alternativa não-invasiva de rastreamento de estado fisiológico (GONÇALVES, 2012). Adicionalmente, trata-se de uma ferramenta para a investigação quantitativa e qualitativa das alterações funcionais e/ou da propensão à manifestação de doenças associadas ao envelhecimento, uma vez que apenas a idade cronológica não é um marcador suficiente e, sobretudo, o envelhecimento ocorrer de forma diferente de uma pessoa para outra pela influência de hábitos, alimentação, informação genética e outras variáveis (SEBASTIANI et al., 2017).

Essa estratégia de identificar as alterações funcionais e da composição biológica relacionadas ao avanço da idade usa parâmetros denominados, portanto, de marcadores bioquímicos do envelhecimento (BÜRKLE et al., 2015).

Há vários marcadores bioquímicos sistêmicos já associados às doenças degenerativas. Os marcadores metabólicos são descritos como um dos primeiros fatores de risco para ao comprometimento cognitivo ao promover efeitos diretos sobre os neurônios e vasos através da aterosclerose e/ou da inflamação crônica do cérebro quando sua homeostase não é mantida. Com foco no perfil lipídico e corroborando essa hipótese, estudos recentes sugerem que a concentração do colesterol sérico é 10% maior em pacientes com Doença de Alzheimer já diagnosticado em relação a pacientes

saudáveis, mostrando-se também como um gatilho acelerador para a formação das placas beta-amiloides (HABCHI et al., 2018).

Os metais traços são cofatores essenciais para enzimas antioxidantes além de participar do metabolismo cerebral controlando a síntese de neurotransmissores, a transição nervosa e estão diretamente envolvidos no controle do estresse oxidativo (SIRABELLA et al., 2018). O cobre desempenha um papel indispensável na fisiologia do sistema nervoso central e seus níveis intracelulares são finamente regulados. O zinco é um oligoelemento fisiologicamente onipresente, sendo um componente catalítico, estrutural e regulador em milhares de metaloproteínas humanas, como anidrase carbônica, álcool desidrogenase, fosfatase alcalina, fosfolipase, carboxipeptidase, superóxido dismutase de zinco/cobre (que, na ausência de zinco, agrega-se em formas amiloides) e outras proteínas alostéricas (AFOLABI et al., 2019). O ferro representa um metal essencial para a vida, pois tem um papel fundamental como cofator de enzimas envolvidas em vários processos metabólicos, como síntese de DNA, RNA e proteínas e reações de oxidação mitocondrial (SIRABELLA et al., 2018). Outro elemento importante no controle do estresse oxidativo, cuja presença é indispensável para a estabilização de enzimas é o manganês, cuja principal ação é prevenir o estresse oxidativo causado pelos radicais livres de óxido nítrico (CARBALLAL et al., 2018). O selênio é oligoelemento com função essencial na atividade de proteínas com alta atividade fisiológica que, embora estejam presentes em baixas concentrações no cérebro, estudos relataram sua relevância para a função neurológica normal, principalmente por sua atividade antioxidante e mecanismos que modulam a função mitocondrial (CARDOSO et al., 2017).

Sabe-se que a deficiência desses metais supracitados, em indivíduos adultos, causa problemas neurodegenerativos, por depressão, esquizofrenia, doenças de Alzheimer, doenças de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica (PRASAD, 2009). Nesse contexto, a alimentação saudável tem sido bastante relevante na prevenção dessas doenças onde estudos revelam a importância na manutenção isolada ou combinada nos níveis de nutrientes como vitaminas, ômega 3, selênio, zinco e ferro na redução do risco de demência e no retardo do declínio cognitivo e motor (BIGUETI, B.; DE LELLIS, J.; DIAS, J., 2018).

Em 2017, Sebastiani e colaboradores correlacionaram as alterações no padrão de vários marcadores bioquímicos (hematológicos, inflamatórios e metabólicos) com o avanço da idade de forma conjunta, em um estudo envolvendo cerca de cinco mil participantes. Esse trabalho revelou que a relevância do perfil de marcadores bioquímicos como uma “assinatura” no prognóstico de doenças. Cada combinação torna possível inferir tendências à manifestação de doenças específicas, dentre elas o comprometimento cognitivo. Assim, levanta-se a ideia que a manifestação de uma patologia é resultante de um conjunto de variações sincrônicas e não apenas creditada a um fator comprometedor mesmo que seja sistêmico (SEBASTIANI et al., 2017).

1.2 JUSTIFICATIVA

Das alterações inerentes à senescência humana, uma das principais é a mudança no padrão de marcadores bioquímicos específicos como do metabolismo, processo inflamatório, ação hormonal e concentração de metais. Essas alterações predizem a maioria das doenças associadas ao avanço da idade, como as doenças neurodegenerativas e o câncer (GIORGIO, 2014).

A neurodegeneração observada em doenças relacionadas ao envelhecimento como Esclerose Lateral Amiotrófica, Doença de Huntington, Doença de Parkinson e Alzheimer está relacionada com o acúmulo de agregados proteicos tóxicos e/ou ERO (JANER et al., 2006). É interessante supor que as alterações com o avanço da idade de marcadores bioquímicos específicos podem estar associadas à manifestação de doenças neurodegenerativas uma vez que estes possuem atividade importante no controle do estresse oxidativo, metabólico e estrutural celular.

Tendo em vista o crescimento da população idosa e do aumento da expectativa de vida (BRASIL, 2017) é de extrema relevância o desenvolvimento de estudos que tenham como foco a saúde e os processos fisiológicos intrínsecos desta população e que contribuam para o esclarecimento das circunstâncias características desta fase da vida. Uma vez estudadas, as doenças associadas ao envelhecimento serão melhor compreendidas e as possibilidades de tratamento, prevenção e cura serão maximizadas para trazer maior qualidade de vida a este crescente grupo populacional.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

O presente trabalho é um estudo analítico-descritivo transversal e busca determinar quais marcadores bioquímicos se alteram com o avanço da idade e de que forma essas alterações se relacionam com a manifestação de doenças neurodegenerativas com relacionadas a danos no corpo celular.

2.2 ESPECÍFICOS

- Investigar retrospectivamente, em dados laboratoriais, o padrão de alteração com o avanço da idade dos mais relevantes marcadores bioquímicos;
- Com base nos resultados do estudo retrospectivo e as informações trazidas pela literatura, avaliar o perfil de marcadores bioquímicos em idosos e adultos, com ou sem comprometimento neurológico.
- Identificar quais marcadores bioquímicos estão associados com a manifestação de doenças neurodegenerativas relacionadas a danos no corpo celular;
- Identificar se os níveis dos marcadores bioquímico selecionados estão relacionados com a gravidade e/ou com o avanço das doenças neurodegenerativas relacionadas a danos no corpo celular.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PRIMEIRA ETAPA: ANÁLISE RETROSPECTIVA DE MARCADORES BIOQUÍMICOS SÉRICOS

Esta etapa foi desenvolvida em parceria com o Laboratório de Análises Clínicas Master Lab, em Foz do Iguaçu. Foram coletados dados referentes a resultados anteriores dos principais marcadores bioquímicos relacionados ao estado hormonal, nutricional, metabólico, hepático, pancreático e inflamatório de pacientes com idade superior a 20 anos, cujos valores já tenham sido descritos como alterados durante o envelhecimento.

As informações foram coletadas do *software* de gerenciamento laboratorial utilizado pela empresa, onde são armazenadas informações relacionadas aos pacientes e os resultados das análises. Desta forma, foram rastreados 600 resultados para cada um dos 35 marcadores bioquímicos estudados, sendo 300 de pacientes homens e 300 de pacientes mulheres, trazendo-os pareados com a idade de cada indivíduo.

A análise retrospectiva de dados laboratoriais locais teve como finalidade, em conjunto com a literatura, nortear e restringir a análise dos marcadores bioquímicos na segunda fase da pesquisa, selecionando aqueles que tenham relação com o avanço da idade e podem estar associados à degeneração.

3.1.1 Tratamento dos dados

Os dados foram organizados em planilhas para a análise estatística que foi realizada pelo *software* de domínio público *BioEstat* 5.3. Os resultados das dosagens dos marcadores bioquímicos foram analisados por meio do Teste T, sendo considerados estatisticamente significativos os valores de $p < 0.05$. Graficamente, os resultados foram apresentados em média.

3.2 SEGUNDA ETAPA: AVALIAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL DOS GRUPOS

3.2.1 Amostra

Um total de 100 voluntários foi submetido aos critérios de inclusão e exclusão e subsequentemente dividido em vários grupos comparativos envolvendo faixa etária, tipo de comprometimento e nível de comprometimento neurológico. O grupo de adultos foi composto por pessoas de ambos os sexos, saudáveis e com idades entre 20 e 59 anos. Os grupos de idosos foram compostos por pessoas de ambos os sexos e acima de 60 anos, diferindo entre si pela presença ou não de comprometimento neurológico.

Foram excluídos do estudo voluntários ou amostras provenientes de pessoas com doenças infecciosas agudas e/ou de manifestação sazonal, portadores de doenças crônicas não neurodegenerativas e/ou transtornos mentais de outras origens, deficiência visual e/ou auditiva total, gestantes, pessoas com idade igual ou inferior a 19 anos e que façam uso de medicamentos anti-inflamatórios, antibióticos e/ou aporte de vitaminas.

3.2.2 Considerações Éticas

O projeto foi aprovado pela administração do Laboratório de Análises Clínicas Master Lab, pela presidência da Associação de Amparo do Idoso de Foz do Iguaçu e pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro Universitário Dinâmica das Cataratas sob o parecer do termo substanciado de número 2.734.884 emitido em 25 de junho de 2018.

3.2.3 Procedimentos da pesquisa

3.2.3.1 Avaliação clínica e laboratorial dos grupos

Os voluntários recrutados só iniciaram as avaliações após concordarem com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO A) e orientados sobre a importância da veracidade das suas respostas durante a aplicação das avaliações.

Esta etapa da pesquisa foi desenvolvida em duas etapas. Primeiro, os participantes passaram por duas avaliações cujas respostas foram registradas em formulário próprio: avaliação clínica geral (APÊNDICE A), avaliação de função cognitiva,

por meio do Mini Exame do Estado Mental (MEEM) (ANEXO A), avaliação de função motora, por meio da seção III do *Unified Parkinson Disease Rating Scale* (versão MDS-UPDRS) (ANEXO B). Em seguida, foram colhidas amostras de sangue periférico para análise laboratorial que dosou marcadores bioquímicos determinados por significância estatística na primeira fase da pesquisa, sendo: colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, colesterol VLDL, triglicerídeos, ferro, zinco, alumínio, selênio, cobre, manganês, malondialdeído e capacidade antioxidante total.

3.2.4 Instrumentos

3.2.4.1 Avaliação clínica geral

A primeira avaliação foi uma anamnese através de um questionário próprio para verificar se os voluntários atendem aos critérios de inclusão e exclusão e para fornecerem informações a respeito de sua condição clínica que influenciarão as análises estatísticas e correlações. A anamnese consistiu da identificação pessoal e investigação de uso de medicamentos e de doenças autodeclaradas, bem como a obtenção de quaisquer informações relevantes sobre suas condições clínicas gerais.

3.2.4.2 Mini Exame do Estado Mental (MEEM)

O Mini Exame do Estado Mental (MEEM) é um instrumento de avaliação do estado cognitivo criado por Folstein, em 1975. Seu objetivo é revelar alterações cognitivas com base no seu comprometimento, sem fins diagnósticos. O teste consiste em perguntas e tarefas que avaliam a orientação temporal e espacial, memória evocada, atenção, cálculo, linguagem e capacidade construtiva visual cuja pontuação pode variar entre 0 e 30 (CALAND, 2015). Essa avaliação pode revelar o declínio da capacidade cognitiva em escala quantitativa de gravidade.

3.2.4.3 Unified Parkinson Disease Rating Scale (MDS-UPDRS)

O MDS-UDPRS é um instrumento para monitoramento da progressão da doença de Parkinson, desenvolvida em 1987. A versão recente do teste é dividido em quatro sessões avaliativas, entretanto, para este trabalho, usamos a segunda sessão que

avaliou a influência dos sintomas motores nas atividades de vida diária. Adicionalmente, extrapolamos suas escalas para o comprometimento motor de outros quadros senis não associados, necessariamente ligados à doença de Parkinson.

3.2.5 Coleta e armazenamento de material biológico

A coleta das amostras de sangue venoso dos voluntários foi realizada em tubos do sistema Vacuteiner® descartáveis. Foram coletados 30 mL de sangue de cada indivíduo, divididos em três tubos secos com gel separador e um tubo TRACE. Após a coleta, as amostras foram levadas em caixa de isopor adequada para transporte de amostras biológicas para o Laboratório Master Lab para a realização das análises terceirizadas, e para a Universidade Federal da Integração Latino Americana, onde foram centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos no prazo máximo de duas horas, para análise parcial e acondicionamento do material para análise posterior. Os soros obtidos foram parcialmente analisados e em seguida o restante foi transferido para tubos de microcentrifuga identificados para armazenamento em freezer a -80°C até o momento da realização das últimas análises.

3.2.6 Doseamento de marcadores bioquímicos

Os marcadores bioquímicos do envelhecimento selecionados nas etapas anteriores foram determinados em soro por meio de ensaio enzimático-colorimétrico, conforme a natureza dos analitos.

3.2.6.1 *Dosagens terceirizadas*

A dosagem de colesterol LDL, colesterol VLDL, ferro, zinco, cobre, selênio, manganês, alumínio e malondialdeído foram realizadas no laboratório terceirizado Hermes Pardini, em Belo Horizonte-MG, sendo o envio das amostras realizado no mesmo dia da coleta. A metodologia laboratorial empregada em ambos os laboratórios foi automatizada e amplamente utilizada em laboratórios clínicos.

O detalhamento analítico contendo informações sobre a metodologia e a amostra utilizada para cada biomarcador estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 – Detalhamento analítico

Biomarcador	Metodologia	Material
Colesterol VLDL	Colorimétrico enzimático	Soro
Colesterol LDL	Colorimétrico enzimático	Soro
Ferro	Colorimétrico	Soro
Zinco	Espectrofotometria de absorção atômica por chama – método <i>in house</i>	Soro
Cobre	Espectrofotometria de absorção atômica por chama – método <i>in house</i>	Soro
Alumínio	Espectrofotometria de absorção atômica por forno de grafite – método <i>in house</i>	Soro
Manganês	Espectrofotometria de absorção atômica por forno de grafite – método <i>in house</i>	Soro
Selênio	Espectrofotometria de absorção atômica por forno de grafite – método <i>in house</i>	Soro
Malondialdeído	Colorimétrico	Soro

3.2.6.2 Dosagem de colesterol total

Para a dosagem de colesterol foi utilizado o kit comercial Colesterol PP da marca Gold Analisa. O kit é enzimático-colorimétrico e baseia-se na reação de ponto final do fenol e da 4-aminoantipirina com o peróxido de hidrogênio, formado na reação em cadeia dos ésteres de colesterol com a enzima colesterol esterase e colesterol oxidase. Essa reação gera um produto marcador de cor vermelha com intensidade quantificável e diretamente proporcional à concentração de colesterol da amostra.

Para a realização do experimento, o sangue coletado em tubo seco com gel separador foi centrifugado a 3000rpm por 15 minutos para obtenção do soro. A análise seguiu com a pipetagem, em tubos de ensaio de poliestireno 12x75mm, de 1000 µL do reagente de cor junto a 10 µL de soro para os tubos de amostras-teste e junto a 10 µL de solução padrão (200mg/dL) para os tubos de calibração do equipamento realizada em triplicata. Para zerar o aparelho foi preparado um tubo contendo apenas o reagente de cor (branco).

Todos os tubos (testes, padrões e branco) foram incubados a 37°C durante 10 minutos e a leitura foi realizada por espectrofotômetro semiautomático com filtro de 505nm. A metodologia obedece a lei de Lambert-Beer e, portanto, a concentração da amostra é calculada através do Fator de Calibração (concentração do padrão/absorbância do padrão) multiplicado pela absorbância da amostra. O resultado é expresso em mg/dL.

3.2.6.3 Dosagem de colesterol HDL

Para a dosagem de colesterol foi utilizado o kit comercial Colesterol HDL PP da marca Gold Analisa. Inicialmente é promovida a precipitação dos quilomicrons, das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) pela adição de um precipitante contendo fosfotungstato e íons magnésio (250 µL) ao soro (250 µ). A mistura é centrifugada a 3500rpm durante 15 minutos para obtenção de um sobrenadante contendo apenas lipoproteínas de alta densidade (HDL).

A segunda etapa da reação consiste na dosagem de colesterol na porção sobrenadante (contendo apenas HDL) e, portanto, segue os mesmos princípios, técnicas, cálculos e reagente de cor da dosagem do colesterol total (descrita no item 3.6.2), diferindo apenas nos volumes pipetados em cada tubo de ensaio e na concentração do padrão: são pipetados 1000 µL do reagente de cor junto a 100 µL de sobrenadante para os tubos de amostras-teste e junto a 100 µL de solução padrão (40mg/dL) para os tubos de calibração do equipamento realizada em triplicata. Para zerar o aparelho também foi preparado um tubo contendo apenas o reagente de cor (branco).

3.2.6.4 Dosagem de triglicerídeos

Para a dosagem de triglicerídeos foi utilizado o kit comercial Triglicerídeos PP da marca Gold Analisa. O kit é enzimático-colorimétrico e baseia-se na reação de ponto final do 4-aminoantipirina e 4-clorofenol com o peróxido de hidrogênio, formado após o glicerol, gerado pela hidrólise dos triglicerídeos pela lipase lipoproteica, ser fosforilado a glicerolfostato pela glicerolquinase e, posteriormente, oxidado pela glicerol-3-fostado oxidase. Essa reação gera um produto marcador de cor vermelha com

intensidade quantificável e diretamente proporcional à concentração de colesterol da amostra.

Para a realização do experimento, o sangue coletado em tubo seco com gel separador foi centrifugado a 3000rpm por 15 minutos para obtenção do soro. A análise seguiu com a pipetagem, em tubos de ensaio de poliestireno 12x75mm, de 1000 μ L do reagente de cor junto a 10 μ L de soro para os tubos de amostras-teste e junto a 10 μ L de solução padrão (200mg/dL) para os tubos de calibração do equipamento realizada em triplicata. Para zerar o aparelho foi preparado um tubo contendo apenas o reagente de cor (branco).

Todos os tubos (testes, padrões e branco) foram incubados a 37°C durante 10 minutos e a leitura foi realizada por espectrofotômetro semiautomático com filtro de 505nm. A metodologia obedece a lei de Lambert-Beer e, portanto, a concentração da amostra é calculada através do Fator de Calibração (concentração do padrão/absorbância do padrão) multiplicado pela absorbância da amostra. O resultado é expresso em mg/dL.

3.2.6.5 Avaliação da Capacidade Antioxidante Total (CTA)

Para a avaliação da capacidade antioxidante total das amostras foi utilizado o kit comercial Antioxidant Assay Kit da marca Cayman Chemical, capaz de quantificar a atividade de todos os componentes antioxidantes hidrossolúveis e lipossolúveis na amostra testada (vitaminas, proteínas, lipídeos, glutathione, metais e etc.), baseando-se na competência antioxidante desta em inibir a oxidação do ABTS® pela metamioglobina. A porção oxidada do ABTS® poderá ser quantificada por espectrofotometria, gerando leituras proporcionalmente menores quanto maior a força antioxidante da amostra. A capacidade dos antioxidantes da amostra são comparadas à capacidade antioxidante de uma solução padrão de Trolox (um análogo hidrossolúvel do tocoferol).

Para a realização do experimento o sangue coletado em tubo seco com gel separador foi centrifugado a 2000g durante 15 minutos a 4°C, para obtenção do soro. O material foi armazenado congelado a -80°C em tubos de microcentrífuga até o término de todas as coletas para que pudessem ser analisados em conjunto.

Os reagentes do kit (solução tampão, solução de Trolox, metamioglobina, cromógeno ABTS® e peróxido de hidrogênio) foram reconstituídos e diluídos conforme as orientações do manual. A análise seguiu com a pipetagem dos reagentes preparados junto ao soro para avaliação das amostras ou junto à diferentes concentrações da solução de Trolox (solução utilizada como padrão antioxidante para gerar a curva de absorbâncias comparadas às amostras de soro). Ambas as análises foram desenvolvidas em microplacas adicionando em cada poço: 10 µL de amostra ou solução de Trolox, 10 µL de metamioglobina, 150 µL do cromógeno ABTS® e, por último, 40 µL de peróxido de hidrogênio (que inicia a reação).

Após a reação correr por 5 minutos, as placas foram lidas por leitor de placas por espectrofotometria em temperatura ambiente, utilizando filtro de 405nm. O resultado da CTA foi expresso em mM Trolox (milimolar Troloxequivalente) utilizando a fórmula $CTA (mM) = (absorbância da amostra - interceptação da curva em y da curva de Trolox) / inclinação da curva de Trolox$.

3.7 TRATAMENTO DOS DADOS

Os dados foram organizados em planilhas para a análise estatísticas realizadas pelo *software* estatístico IBM SPSS. Os resultados das dosagens dos marcadores bioquímicos foram submetidos à análise de normalidade (Shapiro Wilk) e homogeneidade de variâncias (teste de Levene). Para os dados normais e com variância de distribuição homogênea foram realizadas análises de variância de uma via (*one-way ANOVA*) seguidas do teste de correção *post hoc* de Tukey (para análises três grupos ou mais) e Teste T (para análise de dois grupos). Para os dados não normais ou com variância de distribuição não homogêneas foram realizados testes de Kruskal-Wallis com *post hoc* de Mann-Whitney Tukey (para análises três grupos ou mais) ou diretamente Mann-Whitney (para casos com apenas dois grupos). O coeficiente de correlação de Pearson ou Spearman (selecionado de acordo com a normalidade dos dados) foi calculado para a determinação da relação entre os analitos e os *scores* das avaliações e à variação de idade. Foram considerados estatisticamente significativos os valores de $p < 0.05$ e os resultados serão representados graficamente em média.

3.8 GERENCIAMENTO DE DADOS DA PESQUISA

Os dados coletados durante todo o período da pesquisa são confidenciais e sigilosos, sendo utilizados somente para fins de publicação e divulgação científica, sem exposição da identidade dos participantes. Dessa forma, somente o pesquisador principal e o orientador têm acesso aos dados pessoais dos participantes. Outros dados científicos serão exclusivos para pesquisadores vinculados ao laboratório, os quais só poderão fazer uso seguindo os critérios de confiabilidade.

Os dados e amostras coletadas ficarão armazenados por tempo indeterminado no Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da UNILA.

4 RESULTADOS

Após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, um total de 95 voluntários participaram da pesquisa completa, sendo divididos em adultos (n= 47) e idosos (n= 48). Foram feitas diversas análises dividindo-os em grupos para melhor processamento dos dados.

Para possibilitar as análises estatísticas, os comprometimentos foram estratificados de acordo com os scores obtido nos testes aplicados (MEEM e UPDRS). Observando os resultados do MEEM com referência ao comprometimento mental, aqueles com scores inferiores a 6 foram classificados com comprometimento grave; os com score entre 7 e 12, com comprometimento moderado; os com score entre 13 e 17, com comprometimento leve; e os com score entre maior que 18 sem comprometimento. Observando os resultados do UPDRS com referência ao comprometimento motor, aqueles com scores inferiores a 10 foram classificados sem comprometimento; os com score entre 11 e 19, com comprometimento leve; os com score entre 20 e 29, com comprometimento moderado; e os com score superior a 30, com comprometimento grave.

A classificação geral, independentemente do tipo de comprometimento, obedeceu a regra do pior score como ponto de corte.

A pontuação dos testes cognitivos e motores revelou um declínio progressivo no desempenho com o avanço da idade. A figura 1, por meio de um gráfico de dispersão de pontos, cruza a idade dos voluntários e os scores obtidos pelo UPDRS e MEEM, respectivamente.

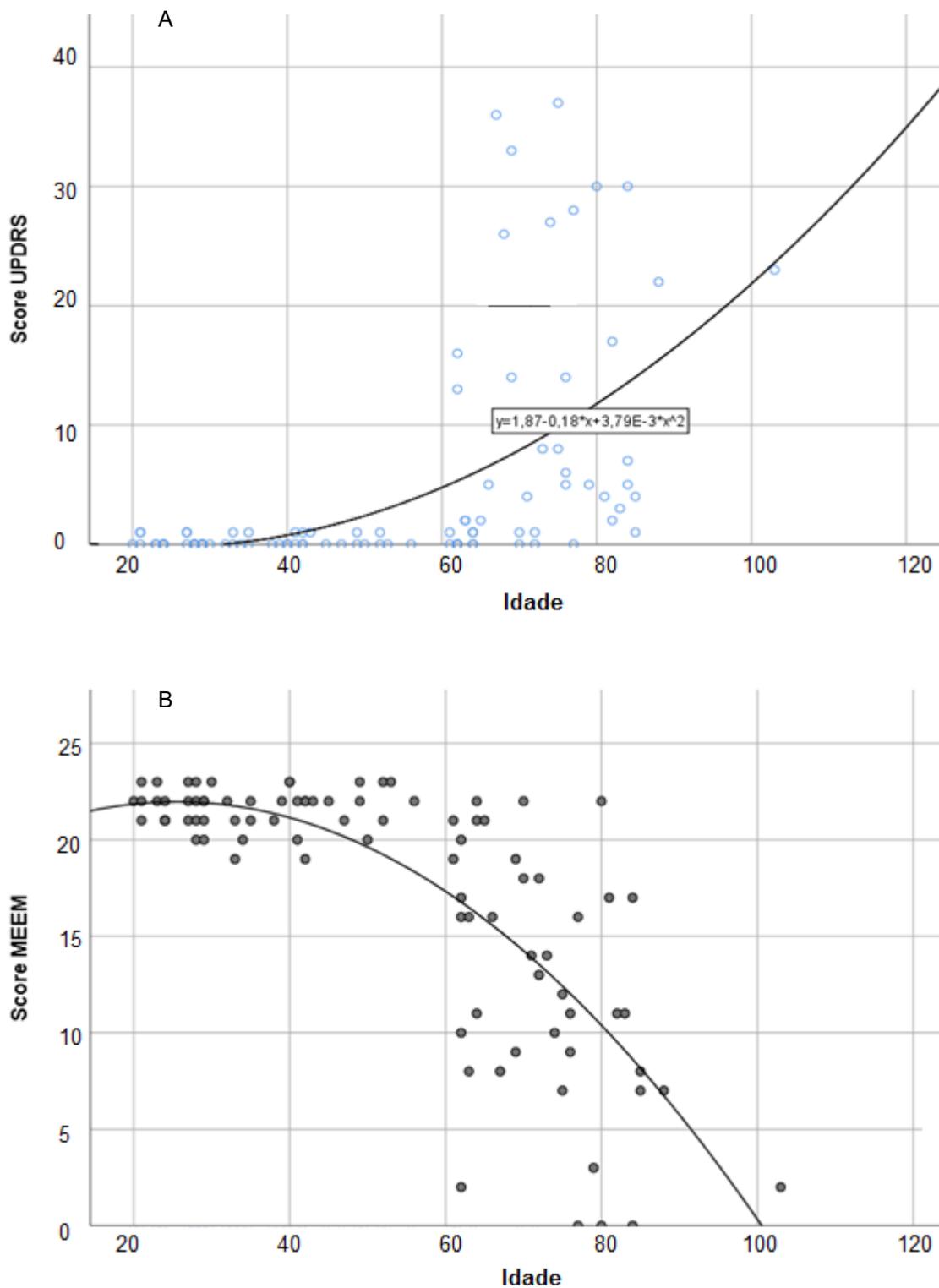
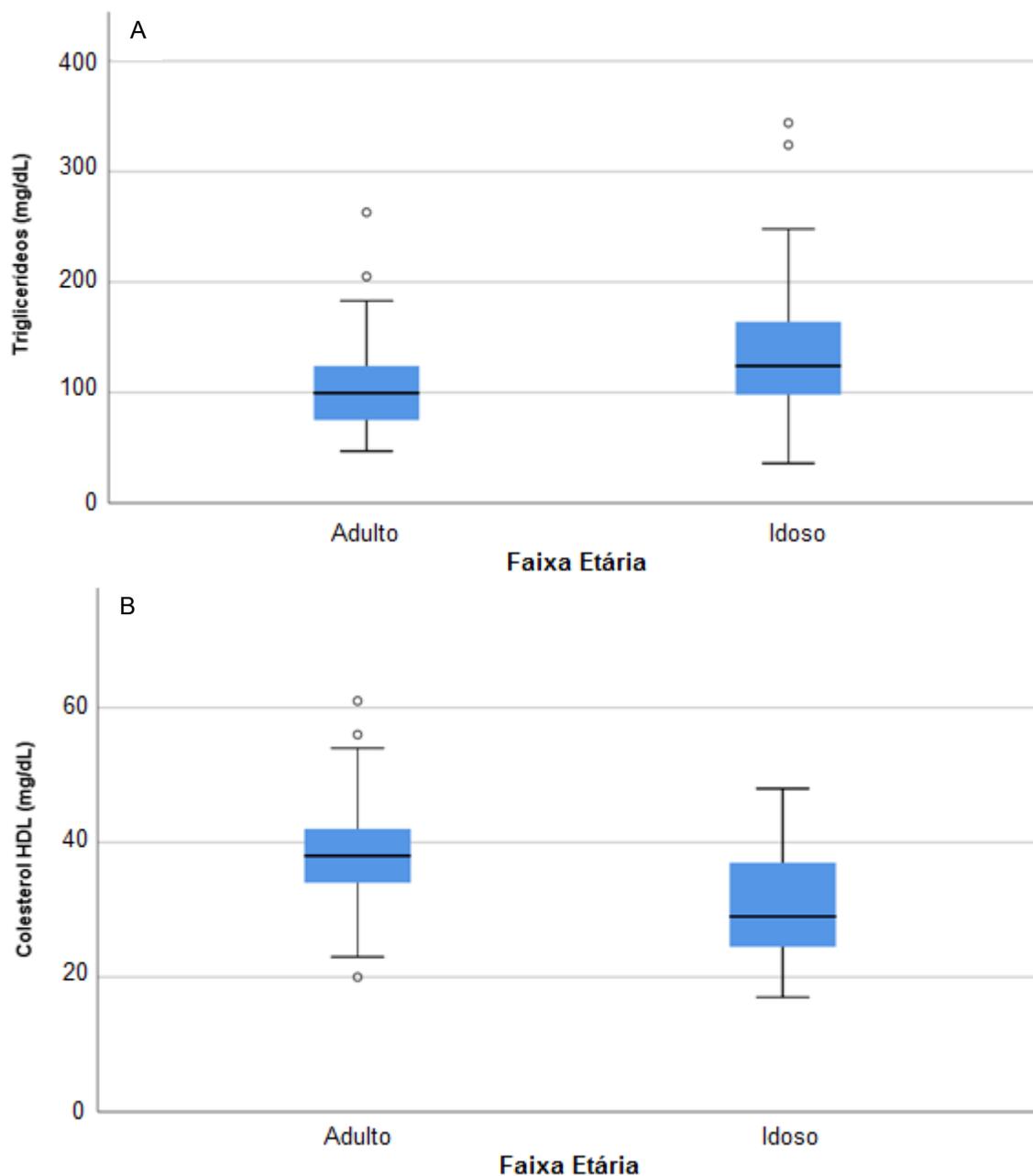


Figura 1. Relação entre comprometimento cognitivo e motor com relação à idade. Resultados das avaliações dos voluntários para o UPDRS (A), na avaliação motora, e MEEEM (B), para avaliação cognitiva, ambos com relação à idade.

Diferenças significativas foram observadas entre o perfil lipídico de adultos e idosos, com aumento do colesterol total, lipoproteínas de baixa densidade (LDL), lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) e triglicerídeos e diminuição do colesterol das lipoproteínas de alta densidade (HDL) com o aumento da idade (figura 2).



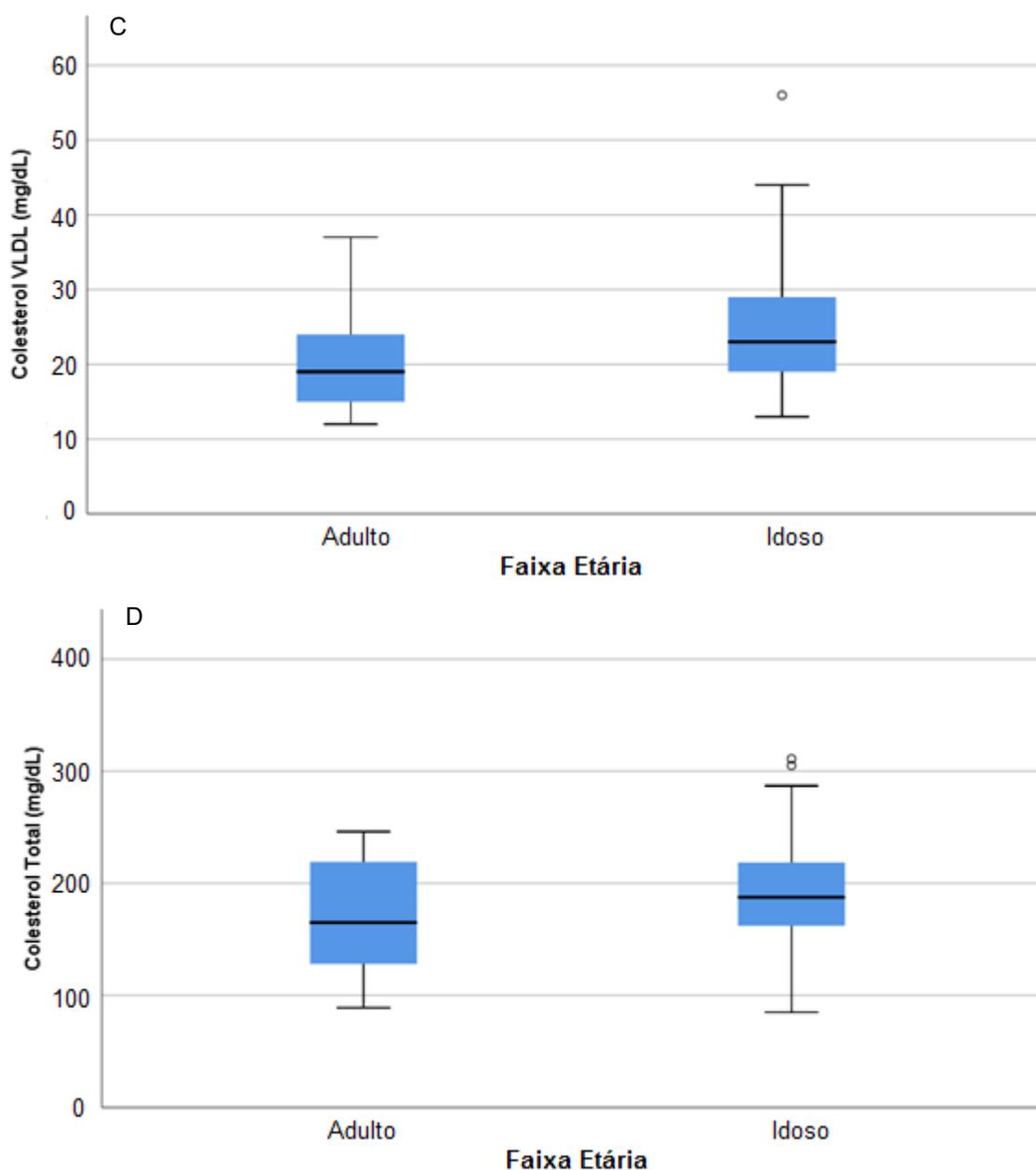
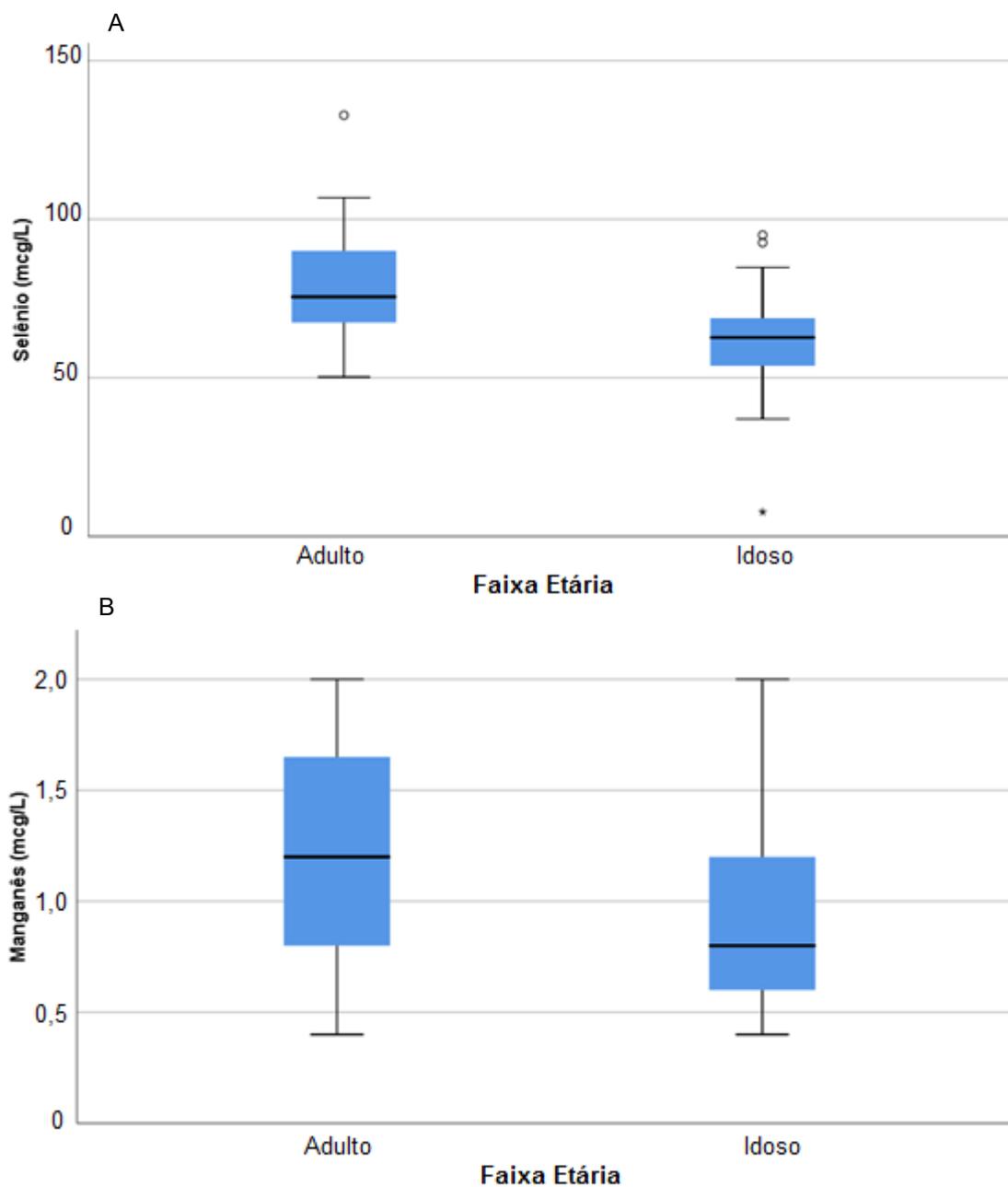


Figura 2. Variação no perfil lipídico de acordo com a faixa etária. Resultados agrupados das dosagens de triglicerídeos (A), colesterol HDL (B), colesterol VLDL (C) e colesterol total (D), representados em gráficos de caixas para os dois grupos etários estudados.

Observou-se uma diminuição de metais com função antioxidante como ferro, selênio e manganês em idosos voluntários em relação aos adultos voluntários (Figura 3), além da presença de valores ainda mais baixos nos idosos voluntários com

piores escores nos testes motores e cognitivos quando comparados aos idosos voluntários com escores normais nos mesmos testes (Figura 4).



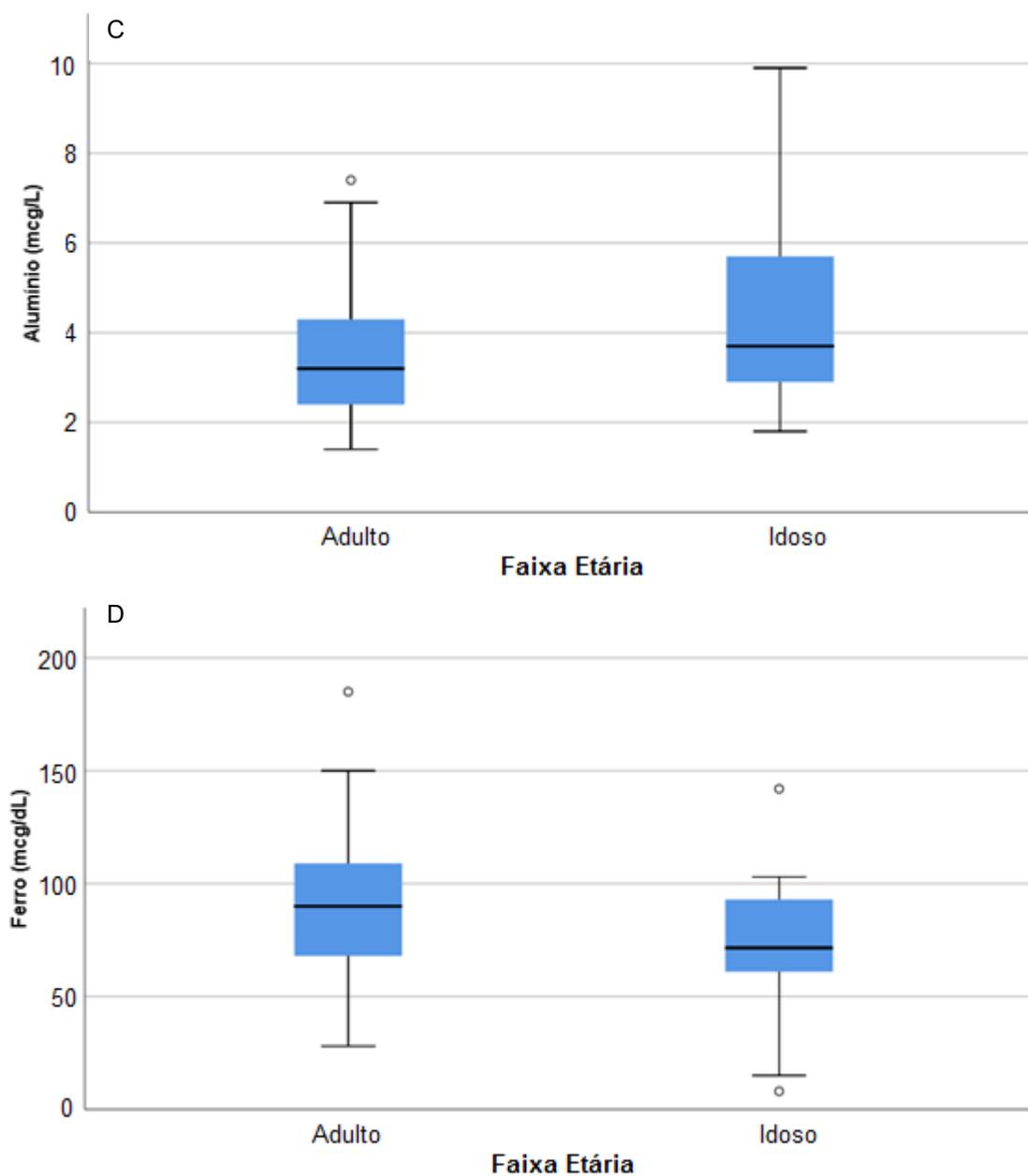


Figura 3. Variação da concentração sérica de metais de acordo com a faixa etária. Resultados agrupados das dosagens de selênio (A), manganês (B), alumínio (C) e ferro (D), representados em gráficos de caixas para os dois grupos etários estudados.

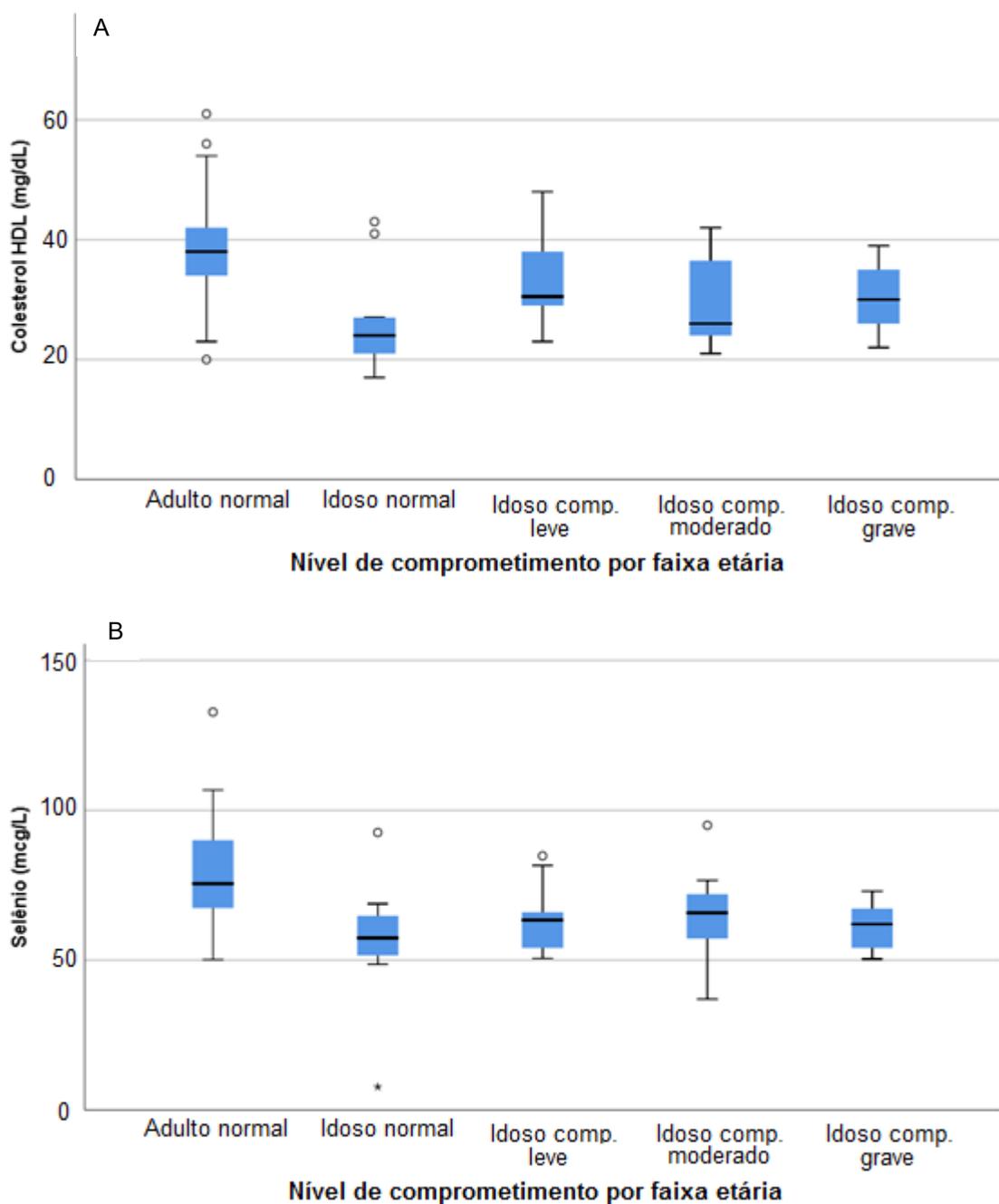


Figura 4. Variação na concentração sérica de colesterol HDL (A) e selênio (B) de acordo com o nível de comprometimento por faixa etária. Resultados das dosagens agrupados e representados em gráficos de caixas por grupo.

Níveis mais baixos de selênio e manganês foram observados em voluntários idosos com algum tipo de comprometimento devido à neurodegeneração, e o manganês parece mais associado a declínios cognitivos (Figura 5).

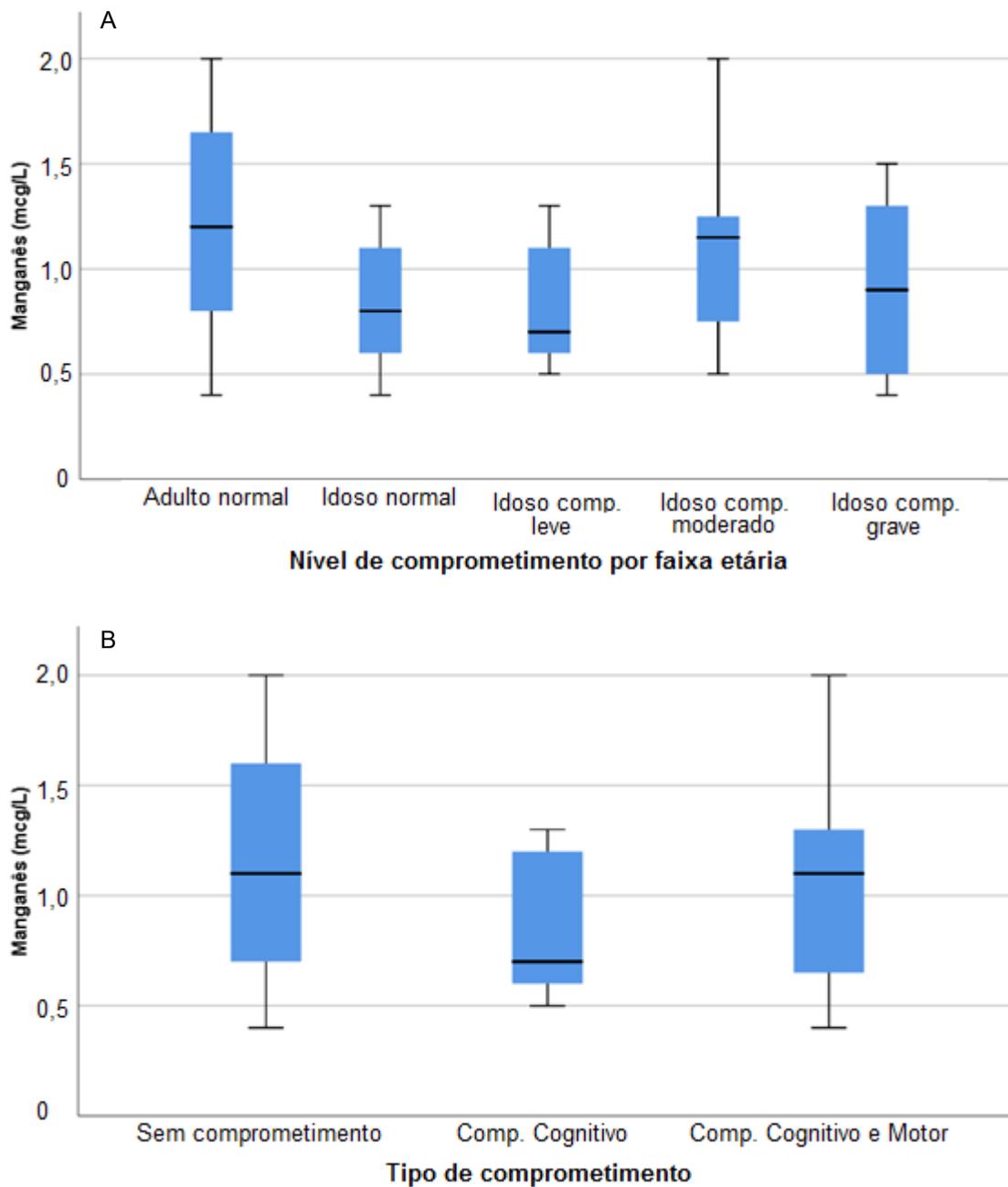


Figura 5. Variação na concentração sérica de manganês de acordo com o nível de comprometimento por faixa etária (A) e com o tipo de comprometimento (B). Resultados das dosagens agrupados e representados em gráficos de caixas por grupo.

Existem mudanças significativas no perfil lipídico e nos traços de metais entre voluntários adultos e idosos, e reduções significativas na concentração desses metais em indivíduos idosos com diferentes níveis de comprometimento.

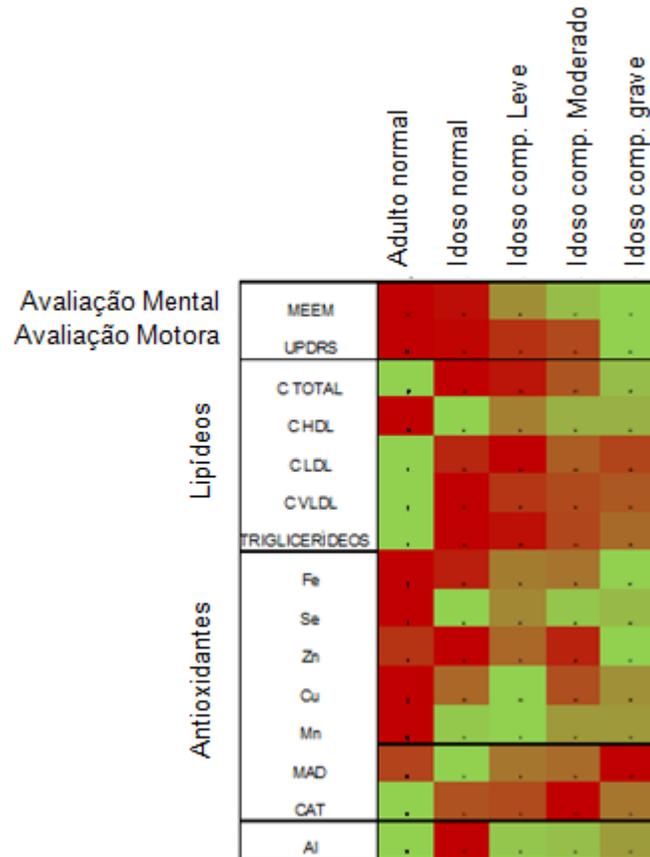


Figura 6. Variação na concentração sérica de marcadores bioquímicos com relação à idade e ao nível de comprometimento. Resultados das dosagens agrupados e representados em média em gráfico de temperatura

Dos marcadores analisados, é possível observar uma importante mudança em conjunto na concentração de metais traço como ferro, selênio, zinco e cobre. Um aumento na lipoperoxidação (MAD) pôde ser também observado em idosos com comprometimento severo da capacidade cognitiva, além de um decréscimo da capacidade antioxidante total (CAT) e dos níveis de zinco em idosos com comprometimento moderado (Figura 6).

Em contraste com o descrito na literatura, o alumínio não parece estar associado com o avanço ou progressão da neurodegeneração. Observa-se este marcador com concentrações maiores em idosos, mas sem qualquer relação com o nível

de comprometimento, seja ele motor ou cognitivo. Já o manganês mostra-se intimamente relacionado com o avanço do nível do comprometimento, além de estar mais ligado ao comprometimento cognitivo.

5 DISCUSSÃO

Com o avanço da idade verifica-se a redução da concentração sérica de minerais e metais importantes para a manutenção dos sistemas biológicos (PANZIERA et al., 2011). Sob a ótica dessa pesquisa, constatou-se essa redução, principalmente de metais traços com atividade antioxidante direta ou indireta (como cofatores enzimáticos). Essa diminuição pode ser creditada a diversos eventos como deficiência nutricional, alimentação inadequada, comprometimento da capacidade absorptiva e metabólica, entre outros.

No cérebro, em concentrações normais, os íons metálicos são fundamentais para o funcionamento das sinapses (transmissões de sinais entre os neurônios) além de alguns serem cofatores de enzimas antioxidantes importantes. O zinco, por exemplo, faz parte da composição de diversas enzimas, como a superóxido dismutase, e age com o glutamato como neurotransmissor; o ferro está presente em enzimas fundamentais para a síntese de neurotransmissores. O cobre é cofator de enzimas importantes para o metabolismo cerebral, como a superóxido dismutase (junto zinco) e a ceruloplasmina, além de participar da produção de neurotransmissores (SIRABELLA, et al. 2018).

Concentrações inferiores às ideais desses metais no sistema nervoso central diminui a atividade de enzimas importantes do arsenal antioxidante biológico enzimático como a superóxido dismutase, que catalisa a conversão do radical superóxido a peróxido de hidrogênio e oxigênio, a catalase, que atua na decomposição de peróxido de hidrogênio a oxigênio e água e a glutathione peroxidase, que atua sobre peróxidos em geral, com utilização de glutathione como cofator. Outros metais e nutrientes importantes no sistema antioxidante não enzimático, como o selênio, tocoferóis, ácido ascórbico, e β -caroteno.

Entretanto, os mesmos íons metálicos supracitados, quando em excesso, provocam toxicidade e potencializam a formação natural de radicais livres, tendo ação oposta e pró-oxidante. Assim, a manutenção das concentrações adequadas destes elementos é de extrema importância, visto que flutuações para mais ou para menos podem ter impactos negativos.

Em paralelo, com o passar dos anos também observa-se diminuição da capacidade celular em controlar seus processos e homeostasia. Com especial relevância para essa discussão, ocorre o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio por alterações no metabolismo mitocondrial durante a respiração celular: as mitocôndrias vão se tornando disfuncionais por inúmeros fatores genéticos, ambientais e comportamentais ao passo que os sistemas de reparo de células e organelas alteradas vão sendo menos eficazes.

Assim, no cenário do envelhecimento descrito, forma-se uma combinação deletéria: o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e diminuição dos componentes antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, permitindo a instalação do estresse oxidativo responsável por danos celulares e teciduais característicos do processo de envelhecimento.

Com o aumento do estresse oxidativo, os radicais livres, que preferencialmente reagem com células gordurosas e, sendo o cérebro e as células nervosas compostos principalmente de gorduras e tendo baixa capacidade de regeneração, a região cerebral é fortemente afetada pela ação dos radicais livres (BARBOSA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2006). Nesse contexto, cria-se um ambiente favorável à neurodegeneração pela morte neuronal e, conseqüentemente, desequilíbrios sinápticos com o comprometimento da produção e liberação de neurotransmissores importantes, como a acetilcolina (com importante ação na memória e aprendizado), a dopamina (importante no controle motor), a serotonina (importante na regulação do humor e apetite).

Dentre as alterações metabólicas no processo de envelhecimento, o metabolismo de lipídios foi identificado como um dos mais significativamente alterados: aumento do colesterol total, da fração LDL e triglicérides e redução da fração HDL. As peculiaridades dessas alterações estão intimamente ligadas às características inerentes ao envelhecimento onde ocorrem mudanças na composição corpórea com, geralmente, ganho de peso, devido ao aumento do tecido adiposo e redução de tecidos muscular e ósseo.

A relação entre o perfil lipídico e as doenças neurodegenerativas é controversa. Enquanto muitos estudos tratam do colesterol como causa importante

destas, outros o colocam apenas como um fator de risco e, com maior contraste, outros negam esta relação e até mesmo o classificam como neuroprotetor. Essa divergência surge por haver evidências de que a hipercolesterolemia está fortemente correlacionada com a presença da proteína amiloide no cérebro, além de influenciar diretamente neurônios e vasos, pela aterosclerose, ou pela inflamação crônica do cérebro (HABCHI et al., 2018). Mas também, outros trabalhos revelam a ação protetora da facilitadora da comunicação neuronal de altos níveis da porção LDL (HUANG et al, 2007; HUANG et al, 2008; WEST et al, 2008).

Essa divergência de resultados pode estar associada à limitação do escopo das pesquisas que não observam outros mecanismos correlacionados. Quando um sistema complexo é avaliado isoladamente, diversos outros fatores estarão sendo ignorados. Ou seja: os níveis de colesterol podem ter um papel positivo ou negativo nos diversos sistemas biológicos dependendo do cenário em que o sistema se encontra. Assim, os níveis de qualquer biomarcador devem ser avaliados dentro de um cenário multifatorial.

Enquanto moléculas de LDL podem ser protetoras das comunicações neuronais, quando num cenário oxidativo desequilibrado, por exemplo, podem desencadear respostas opostas, como a formação das placas amiloides e emaranhados neurofibrilares. O estresse oxidativo associado a dislipidemias forma uma combinação deletéria ao sistema nervoso central.

A explicação para esta combinação de risco está, entre outras situações, no fato dos radicais livres reagirem com o colesterol produzindo aldeídos de colesterol que suprimem a ação das enzimas antioxidantes, principalmente com a SOD, aumentando ainda mais o estresse oxidativo e levando a eventos apoptóticos e inflamatórios (DZIEGIELEWSKA-GESIAKET al., 2019). Esses eventos estão intimamente relacionados com a morte neuronal observada nas doenças neurodegenerativas no geral.

Essas observações trazem a reflexão de que os aspectos positivos ou negativos de marcadores biológicos devem ser avaliados num contexto maior, levando em consideração a combinação destes no organismo vivo e a interação de diversos sistemas.

Os radicais livres associados à dislipidemia e ao desequilíbrio nutricional (principalmente de metais) podem levar a precipitação de agregados tóxicos de fragmentos de proteínas, que contribuem ainda mais para a formação de outros radicais livres e, como consequência, levam a diminuição da capacidade de defesa antioxidante do organismo, o que torna este processo uma reação em cadeia. Logo, a patogenicidade deste cenário está relacionada com a intensidade desses desequilíbrios.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os marcadores bioquímicos relacionados ao perfil metabólico são descritos como um dos primeiros fatores de risco para declínio cognitivo, promovendo efeitos diretos nos neurônios quando a homeostase não é mantida. Nesse contexto, alterações no perfil lipídico estão relacionadas à fisiopatologia da neurodegeneração, bem como alterações no padrão antioxidante celular (LOERA-VALENCIA et al., 2019). Existem múltiplas mudanças simultâneas com o avanço da idade a partir dos mecanismos fisiológicos, celulares e moleculares.

Dois achados importantes marcam este trabalho: manganês e alumínio. Enquanto um parece estar diretamente relacionado com o comprometimento cognitivo (manganês) trazendo novas informações para a comunidade científica. Por outro lado, e confrontando as hipóteses estudadas até o momento, o alumínio está relacionado apenas com o envelhecimento e não com a manifestação ou progressão de doenças neurodegenerativas relacionadas ao movimento ou cognição.

A manifestação das patologias associadas ao envelhecimento é o resultado de um conjunto de variações biológicas sincrônicas que podem ser parcialmente identificadas por meio de marcadores séricos, como perfil lipídico e níveis de traços de metais que auxiliam a atividade antioxidante. Esses resultados podem contribuir para o entendimento de como os marcadores bioquímicos podem ser utilizados para o diagnóstico e tratamento de doenças relacionadas ao envelhecimento.

7 REFERÊNCIAS

AFOLABI et al. Zinc and Neurodegenerative Disorders. **Handbook of Research on Critical Examinations of Neurodegenerative Disorders**. 2019

AGONDI, R. et al. Imunossenescência. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 35, n. 5, p. 169–176, 2012.

BARBOSA, L. J.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTOS, O. Oxidative damage and neurodegeneration. What have we learned from transgenic and knockout animals? **Quím. Nova**, v. 29, n. 6, 2006.

BRASIL. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Tábua completa de mortalidade para o Brasil em 2016, p. 15, 2017.

CARBALLAL et al. Manganese porphyrin redox state in endothelial cells: Resonance Raman studies and implications for antioxidant protection towards peroxynitrite. **Free Radic Biol Med**, v. 126, p. 379-392, 2018.

CARDOSO et al. Selenium Levels in Serum, Red Blood Cells, and Cerebrospinal Fluid of Alzheimer's Disease Patients: A Report from the Australian Imaging, Biomarker & Lifestyle Flagship Study of Ageing (AIBL). **J Alzheimers Dis**, v. 57, n.1, p. 183-193, 2017.

BIGUETI, B.; DE LELLIS, J.; DIAS, J. Essential nutrients in the prevention of Alzheimer's disease. **Revista Ciências Nutricionais Online**, v.2, n.2, p.18-25, 2018.

BÜRKLE, A. et al. MARK-AGE biomarkers of ageing. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 151, p. 2–12, 2015.

CALAND, L. M. Q. **Correlação entre a avaliação motora do mds- updrs e o movimento rítmico em indivíduos acometidos pela doença de parkinson.**

Dissertação (Mestrado em Educação Física). Faculdade de Educação Física, Universidade de Brasília, p. 101. 2015.

DZIEGIELEWSKA-GESIAK, S. et al. The relationship between plasma lipids, oxidant-antioxidant status, and glycated proteins in individuals at risk for atherosclerosis. **Clin Interv Aging**, v. 9, n. 14, p. 789-796, 2019.

ESQUENAZI, D. de A. Imunossenescência as alterações do sistema imunológico provocadas pelo envelhecimento. **Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto - UERJ**, v. 7, n. 1, p. 38–45, 2008.

FECHINE, B. R. A.; TROMPIERI, N. O processo de envelhecimento: as principais alterações que acontecem com o idoso com o passar dos anos. **Inter Science Place**, v. 1, n. 7, p. 106–132, 2012.

FRANCESCHI, C.; CAMPISI, J. Chronic inflammation (Inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. **Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 69, n. 1, p. 4–9, 2014.

GIORGIO, S. Autofagia celular em processos patológicos. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 35, n. 1, p. 125–136, 2014.

GONÇALVES, G. S. **Biomarcadores de lesão microvascular, de dislipidemia e micropartículas plaquetárias em idosos com e sem comprometimento cognitivo**. 2012. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, p. 163, 2012.

HABCHI, J. et al. Cholesterol catalyses A β 42 aggregation through a heterogeneous nucleation pathway in the presence of lipid membranes. **Nature Chemistry**, v. 10, n. 6, p. 673-683, 2018.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Diretoria de Pesquisas Coordenação de População e Indicadores Sociais. **Tábua completa de mortalidade para o Brasil: breve análise da evolução da mortalidade no Brasil**. Rio de Janeiro; 2017.

JANER, A. et al. PML clastosomes prevent nuclear accumulation of mutant ataxin-7 and other polyglutamine proteins. **Journal of Cell Biology**, v. 174, n. 1, p. 65–76, 2006.

LEITE, L. E. A. et al. Envelhecimento, estresse oxidativo e sarcopenia: uma abordagem sistêmica. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 15, n. 2, p. 365–380, 2012.

LOERA-VALENCIA, R. Alterations in cholesterol metabolism as a risk factor for developing Alzheimer's disease: Potential novel targets for treatment. **J Steroid Biochem Mol Biol**. V. 190, p.104-114, 2019.

MAXAN, A.; CICCHETTI, F. Tau : a common denominator and therapeutic target for neurodegenerative disorders. **Journal of Experimental Neuroscience**, v. 12, p. 1–4, 2018.

METAXAKIS, A.; PLOUMI, C.; TAVERNARAKIS, N. Autophagy in age-associated neurodegeneration. **Cells**, v. 7, n. 37, p. 1–24, 2018.

OLIVEIRA, E. M. N. de. Doenças neurodegenerativas : doença de Parkinson e síndrome de Prader Willi. **Psicologia.pt**, p. 1–8, 2013.

PANZIERA, F. B. et al. Evaluation of antioxidant minerals intake in elderly. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 14, n. 1, p.49-58, 2011.

PEREIRA, C. A. C. **Mecanismos fisiopatológicos do envelhecimento**. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina). Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, p.60 , 2015.

PERFEITO, R.; REGO, A. C. Papel da alfa-sinucleína e da disfunção mitocondrial associada à doença de Parkinson. **Revista Neurociências**, v. 20, n. 2, p. 273–284, 2012.

PRASAD, A. Zinc: Role in immunity, oxidative stress and chronic inflammation. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, v. 12, 2019.

SEBASTIANI, P. et al. Biomarker signatures of aging. **Aging Cell**, v. 16, n. 2, p. 329–338, 2017.

SILVA, W. J. M.; FERRARI, C. K. B. Metabolismo mitocondrial, radicais livres e envelhecimento. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 14, n. 3, p. 441–451, 2011.

SIRABELLA, R. et al. Ionic Homeostasis Maintenance in ALS: Focus on New Therapeutic Targets. **Front Neurosci**. v.12, n. 510, 2018.

TEIXEIRA, I. N. D. O.; GUARIENTO, M. E. Biologia do envelhecimento: teorias, mecanismos e perspectivas. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 15, n. 6, p. 2845–2857, 2010.

VERHEIJEN, B. M.; VERMULST, M.; LEEUWEN, F. W. Van. Somatic mutations in neurons during aging and neurodegeneration. **Acta Neuropathologica**, n. 135, v. 6, p. 811-826, 2018.

WEINERT, B. T.; TIMIRAS, P. S. Physiology of aging: theories of aging. **Journal of applied physiology**, v. 95, n. 4, p. 1706–1716, 2003.

WEINSTEIN, J. D. Alzheimer ' s disease : multiple causes requiring multiple therapies. **Acta Scientific Medical Sciences**, v. 2, n. 2, p. 16–20, 2018.

APÊNDICE A**AVALIAÇÃO CLÍNICA GERAL**

NOME: _____

SEXO: ____ IDADE: ____ ENTRADA: __/__/__ TEMPO DE JEJUM: ____

ID TUBO: ____

HÁBITOS E CONDIÇÕES CLÍNICAS:

TABAGISMO () ATIVIDADE FÍSICA () ÁLCOOL () GESTANTE ()

MEDICAMENTOS:

ANTI-HIPERTENSIVOS () _____

ANTIDIABÉTICOS () _____

ANTI-INFLAMATÓRIOS () _____

PSICOATIVOS () _____

ANTIBIÓTICOS () _____

OUTROS: _____

NENHUM () _____

INFORMAÇÕES CLÍNICAS E HIPÓTESES DIAGNÓSTICAS:

ALTURA: ____ PESO: ____

HIPERPLASIAS () DOENÇAS NEUROLÓGICAS () _____

INFLAMAÇÃO/DORES () _____

OBS:

ANEXO A

TERMO DE CONCENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

Você está sendo convidado a participar, como voluntário, da pesquisa “INVESTIGAÇÃO DE MARCADORES BIOQUÍMICOS NO ENVELHECIMENTO BIOLÓGICO E NO DESENVOLVIMENTO DE DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS”, cujo objetivo é determinar quais marcadores biológicos se alteram com o avanço da idade e de que forma essas alterações se relacionam com a manifestação de doenças neurodegenerativas. Tendo em vista o crescimento da população idosa e do aumento da expectativa de vida, a pesquisa justifica-se na necessidade de estudos que tenham como foco a saúde e os processos fisiológicos intrínsecos desta população e que contribuam para o esclarecimento das circunstâncias características desta fase da vida. Quanto mais estudadas, as doenças associadas ao envelhecimento serão melhor compreendidas e as possibilidades de tratamento, prevenção e cura destas serão maximizadas.

Esta pesquisa consiste em uma avaliação de estado cognitivo através do Mini-Teste de Estado Mental (MEEM) e de uma avaliação motora através da Parte III da Escala Unificada de Avaliação da Doença de Parkinson (UPDRS) e de uma coleta de amostra biológica (sangue) para análise laboratorial.

Você receberá todos os esclarecimentos necessários antes e durante a pesquisa e asseguramos que seu nome não será divulgado, sendo mantido o mais rigoroso sigilo com a omissão total de quaisquer informações que possam identificá-lo. Esta pesquisa não lhe acarretará gastos. Em princípio, as avaliações não possuem contraindicações. Os dados e materiais utilizados na pesquisa ficarão sob a guarda dos

pesquisadores por um período de, no mínimo, cinco anos e após isso serão destruídos ou mantidos na instituição. As informações obtidas neste experimento poderão ser utilizadas como dados de pesquisa científica, podendo ser publicadas e divulgadas. A pesquisa será imediatamente suspensa caso o pesquisador perceba algum risco ou dano à sua saúde, constrangimentos e/ou qualquer tipo de desconforto. No improvável dano físico resultante da participação nesta pesquisa, o tratamento será viabilizado no local mais próximo e apropriado de assistência médica, mas nenhum benefício especial será concedido para compensação ou pagamento de um possível tratamento. A sua participação nesta pesquisa é voluntária, isto é, não há pagamento por sua colaboração.

Esta pesquisa aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Universitário Dinâmica das Cataratas de acordo com o parecer de número 2.734.884 emitido em 25 de junho de 2018. O CEP é composto por profissionais de diferentes áreas cuja função é defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. Em caso de dúvida ou reclamação, você poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável, Marcela Rodrigues Lima, no telefone (45) 99922.5704 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa pelo número 3028-3232.

No caso de aceitar fazer parte da pesquisa, após ter lido e esclarecido sobre as informações acima, você deverá assinar ao final deste documento, que está em duas vias (uma para o voluntário e outra para o pesquisador). Todas as folhas deverão ser rubricadas pelo voluntário da pesquisa ou seu responsável e pelo pesquisador responsável. Ao assinar este documento, você declara ter compreendido as informações que leu ou que foram lidas para você, que foram esclarecidos os propósitos do estudo,

suas condições, e os procedimentos a serem realizados e que concorda voluntariamente em participar ou que autoriza a participação de alguém sob sua responsabilidade.

A pesquisadora declara que obteve de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste participante para a sua composição neste estudo.

Assinatura do participante ou responsável

Data: ___/___/___

Participante _____

Responsável: _____

Endereço: _____

Telefone: () _____

Marcela Rodrigues Lima
Pesquisadora

Data: ___/___/___

ANEXO B

AVALIAÇÃO DE FUNÇÃO COGNITIVA

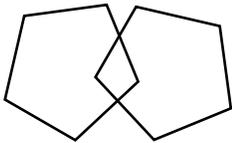
NOME: _____ ID TUBO: _____

ESCOLARIDADE: _____ DATA DO TESTE: ____/____/____

DOENÇA NEUROLÓGICA (SE HOVER): _____

Mini Exame do Estado Mental (MEEM)

Memorização (0 – 3 pts)	Repita as palavras:	Caneca () Tijolo () Tapete ()
Orientação espacial (0 – 5 pts)	Onde estamos?	Estado () Cidade () Bairro () Rua () Local ()
Orientação temporal (0 - 5 pts)	Em que dia estamos?	Ano () Semestre () Mês () Dia () Dia da semana ()
Linguagem (1 pt)	Repita a frase: NEM AQUI, NEM ALI, NEM LÁ	()
Memorização (0 – 3 pts)	Repita as palavras ditas há pouco.	Caneca () Tijolo () Tapete ()
Cálculo (0 – 5 pts)	Soletre a palavra MUNDO de trás pra frente.	O () D () N () U () M ()
Linguagem (0-3 pts)	Mostrar um relógio e uma caneta e pedir para nomeá-los.	Relógio () Caneta ()
Linguagem (0-2 pts)	Siga um comendo de três estágios:	Pegue o papel com a mão direita () Dobre-o ao meio () Ponha-o no chão ()
Linguagem (1 pt)	Escrever em um papel: “feche os olhos”. Pedir ao idoso para que leia a ordem e a execute.	FECHE OS OLHOS ()
Linguagem (1 pt)	Pedir ao idoso para escrever uma frase completa.	()

Linguagem (1 pt)	Copie o desenho:	 ()
------------------	------------------	---

Pontuação total = 30 pontos

Pontuação de corte: Analfabetos = 19; 1 a 3 anos de escolaridade = 23; 4 a 7 anos de escolaridade = 24; > 7 anos de escolaridade = 28

ANEXO C**AVALIAÇÃO DE FUNÇÃO MOTORA**

NOME: _____ ID TUBO: _____
ESCOLARIDADE: _____ DATA DO TESTE: ____/____/____
DOENÇA NEUROLÓGICA (SE HOUVER): _____

Parte II da Escala Unificada de Avaliação da Doença de Parkinson (UPDRS)**A. Fala:**

- 0 = normal;
- 1 = comprometimento superficial. Nenhuma dificuldade em ser entendido;
- 2 = comprometimento moderado. Solicitado a repetir frases, às vezes;
- 3 = comprometimento grave. Solicitado frequentemente a repetir frases;
- 4 = retraído, perda completa da motivação.

B. Salivação:

- 0 = normal;
- 1 = excesso mínimo de saliva, mas perceptível. Pode babar à noite;
- 2 = excesso moderado de saliva. Pode apresentar alguma baba (drooling);
- 3 = excesso acentuado de saliva. Baba frequentemente;
- 4 = baba continuamente. Precisa de lenço constantemente.

C. Deglutição:

- 0 = normal;
- 1 = engasgos raros;
- 2 = engasgos ocasionais;
- 3 = deglute apenas alimentos moles;
- 4 = necessita de sonda nasogástrica ou gastrostomia.

D. Escrita:

0 = normal;

1 = um pouco lenta ou pequena;

2 = menor e mais lenta, mas as palavras são legíveis;

3 = gravemente comprometida. Nem todas as palavras são comprometidas;

4 = a maioria das palavras não são legíveis.

E. Cortar alimentos ou manipular:

0 = normal;

1 = lento e desajeitado, mas não precisa de ajuda;

2 = capaz de cortar os alimentos, embora desajeitado e lento. Pode precisar de ajuda;

3 = alimento cortado por outros, ainda pode alimentar-se, embora lentamente;

4 = precisa ser alimentado por outros.

F. Vestir

0 = normal;

1 = lento mas não precisa de ajuda;

2 = necessita de ajuda para abotoar e colocar os braços em mangas de camisa;

3 = necessita de bastante ajuda, mas consegue fazer algumas coisas sozinho;

4 = não consegue vestir-se (nenhuma peça) sem ajuda;

G. Higiene:

0 = normal;

1 = lento mas não precisa de ajuda;

2 = precisa de ajuda no chuveiro ou banheira, ou muito lento nos cuidados de higiene;

3 = necessita de assistência para se lavar, escovar os dentes, pentear-se, ir ao banheiro;

4 = sonda vesical ou outra ajuda mecânica.

H. Girar no leito e colocar roupas de cama:

0 = normal;

1 = lento e desajeitado mas não precisa de ajuda;

2 = pode girar sozinho na cama ou colocar os lençóis, mas com grande dificuldade;

3 = pode iniciar, mas não consegue rolar na cama ou colocar lençóis;

4 = não consegue fazer nada.

I. Quedas (não relacionadas ao freezing):

0 = nenhuma;

1 = quedas raras;

2 = cai ocasionalmente, menos de uma vez por dia;

3 = cai, em média, uma vez por dia;

4 = cai mais de uma vez por dia.

J. Freezing quando anda:

0 = nenhum;

1 = raro freezing quando anda, pode ter hesitação no início da marcha;

2 = freezing ocasional, enquanto anda;

3 = freezing frequente, pode cair devido ao freezing;

4 = quedas frequentes devido ao freezing.

K. Marcha:

0 = normal;

1 = pequena dificuldade. Pode não balançar os braços ou tende a arrastar as pernas;

2 = dificuldade moderada, mas necessita de pouca ajuda ou nenhuma;

3 = dificuldade grave na marcha, necessita de assistência;

4 = não consegue andar, mesmo com ajuda.

L. Tremor:

0 = ausente;

1 = presente, mas infrequente;

2 = moderado, mas incomoda o paciente;

3 = grave, interfere com muitas atividades;

4 = marcante, interfere na maioria das atividades.

M. Queixas sensitivas:

0 = nenhuma;

- 1 = dormência e formigamento ocasional, alguma dor;
- 2 = dormência, formigamento e dor frequente, mas suportável;
- 3 = sensações dolorosas frequentes;
- 4 = dor insuportável.

ANEXO D



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação de indicadores biológicos e de autofagia no envelhecimento biológico e no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas.

Pesquisador: MARCELA RODRIGUES LIMA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 91323118.0.0000.8527

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DA INTEGRAÇÃO LATINO-AMERICANA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.734.884

Apresentação do Projeto:

O projeto de pesquisa de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, tem como justificativa que alguns biomarcadores têm seu padrão alterado com o avanço da idade, e estas alterações estão relacionadas com a manifestação de doenças degenerativas em consonância com o declínio da autofagia durante o envelhecimento. Sendo a população idosa mais propensa à manifestação de doenças neurodegenerativas, a modulação da autofagia através de algumas estratégias reguladoras é capaz de amenizar essa tendência.

Objetivo da Pesquisa:

O presente trabalho é um estudo analítico-descritivo transversal e busca determinar quais biomarcadores se alteram com o avanço da idade e de que forma essas alterações se relacionam com o declínio dos processos de autofagia e favorecem a manifestação de doenças neurodegenerativas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos descritos adequadamente.

Benefícios os resultados da pesquisa poderão enriquecer discussões sobre doenças neurodegenerativas associadas a idade.

Endereço: Avenida Paraná 5661 Vila A.

Bairro: JARDIM DAS LARANJEIRAS

CEP: 85.868-030

UF: PR

Município: FOZ DO IGUAÇU

Telefone: (45)3028-3232

E-mail: cepudo@udc.edu.br



Continuação do Parecer: 2.734.684

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Protejo pertinente, com referencial adequado e atual, e com relevância para área de saúde.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram devidamente apresentados.

Recomendações:

Em relação ao número de participantes, não constam nos métodos do projeto, apenas nas Informações Básicas do projeto, onde constam 200 participantes. por tanto recomenda-se a adequação do numero de participantes nos dois documentos.

Ajustar o cronograma, quanto ao início da coleta de dados, pois encontra-se com inconsistência em relação a declaração de que os pesquisadores não iniciaram as coletas de dados, sem a apreciação do Comitê de Ética.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado sem pendências, apenas com recomendações.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1151700.pdf	11/06/2018 21:20:17		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoCEP.pdf	11/06/2018 21:19:49	MARCELA RODRIGUES LIMA	Aceito
Folha de Rosto	Folha.pdf	11/06/2018 17:39:47	MARCELA RODRIGUES LIMA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CampoML.pdf	11/06/2018 17:39:39	MARCELA RODRIGUES LIMA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CampoLar.pdf	11/06/2018 17:39:30	MARCELA RODRIGUES LIMA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CampoCCI.pdf	11/06/2018 17:39:23	MARCELA RODRIGUES LIMA	Aceito
Declaração de	Declaracao.pdf	11/06/2018	MARCELA	Aceito

Endereço: Avenida Paraná 5661 Vila A.

Bairro: JARDIM DAS LARANJEIRAS CEP: 85.868-030

UF: PR Município: FOZ DO IGUAÇU

Telefone: (45)3028-3232

E-mail: cepudo@udc.edu.br



**CENTRO UNIVERSITÁRIO
DINÂMICA DAS CATARATAS -
UDC**



Continuação do Parecer: 2.734.884

Pesquisadores	Declaracao.pdf	17:39:10	RODRIGUES LIMA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLECEP.pdf	11/06/2018 15:20:12	MARCELA RODRIGUES LIMA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FOZ DO IGUAÇU, 25 de Junho de 2018

**Assinado por:
PRISCILA FERRI COLDEBELLA
(Coordenador)**

Endereço: Avenida Paraná 5661 Vila A.

Bairro: JARDIM DAS LARANJEIRAS

CEP: 85.868-030

UF: PR

Município: FOZ DO IGUAÇU

Telefone: (45)3028-3232

E-mail: cepudo@udc.edu.br

ANEXO E



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DA INTEGRAÇÃO LATINO-AMERICANA
INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA
CENTRO INTERDISCIPLINAR DE CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS

ANEXO IV DO EDITAL PPG-BC Nº. 07/2019
TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA DIVULGAÇÃO E PUBLICAÇÃO DE
TRABALHOS ACADÊMICOS, ARTIGOS E DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Eu, Marcela Rodrigues Lima, nacionalidade brasileira, CPF nº. 406.869.298-02, documento de identidade RG nº. 47.863.850-4 - SSP/BA, aluno(a) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPG-BC), **AUTORIZO** a Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA), a disponibilizar *on-line* meus trabalhos acadêmicos, artigos e dissertação de mestrado intitulada "Investigação de marcadores bioquímicos no envelhecimento biológico e no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas", podendo também ser acessado através da página eletrônica <<https://portal.unila.edu.br/mestrado/biociencias/>>, bem como pelas demais plataformas oficiais da UNILA e da CAPES, sem qualquer ônus para a UNILA, respeitados os direitos autorais, conforme Portaria CAPES nº. 013, de 15/02/2006.

Informação de acesso ao documento:

Liberação para publicação a partir de 04/02/2020.

Em caso de prerrogativa de publicação, justifique:

Foz do Iguaçu, Estado do Paraná, 04 de fevereiro de 2020.

Marcela Rodrigues Lima

Mestrando(a) do PPG-BC

(UNILA)