

MARIANA SOUZA SILVA BOMFIM

**PERFIL OXIDATIVO DE PACIENTES COM DOENÇA DE ALZHEIMER**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para obtenção do título de Magister Scientiae.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2019

T

B695p  
2019

Bomfim, Mariana Souza Silva, 1981-  
Perfil oxidativo de pacientes com doença de alzheimer / Mariana  
Souza Silva Bomfim. - Viçosa, MG, 2019.  
xi, 37 f. : il. ; 29 cm.

Texto em português e inglês

Inclui anexos.

Orientador: Silvia Almeida Cardoso.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Alzheimer, Doença de. 2. Estresse oxidativo. 3. Demência.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Medicina e  
Enfermagem. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.  
II. Título.


CDD 22. ed. 616.831

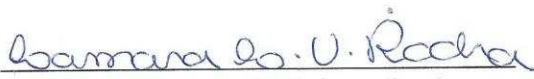
MARIANA SOUZA SILVA BOMFIM

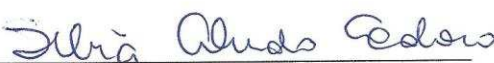
**PERFIL OXIDATIVO DE PACIENTES COM DOENÇA DE ALZHEIMER**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 19 de julho de 2019.

  
\_\_\_\_\_  
Leandro Licursi de Oliveira  
(Coorientador)

  
\_\_\_\_\_  
Lamara Laguardia Valente Rocha

  
\_\_\_\_\_  
Silvia Almeida Cardoso  
(Orientadora)

## **DEDICATÓRIA**

A minha filha Marina, presente de Deus em minha vida. Chegou durante a realização deste mestrado, me permitindo descobrir o tamanho da minha força e a magia da maternidade. Ela me inspira a querer ser mais que fui até hoje!

## AGRADECIMENTOS

Início meus agradecimentos por DEUS, já que Ele me permitiu realizar este sonho e colocou pessoas tão especiais a meu lado, sem as quais certamente não teria dado conta!

Ao meu querido esposo, Humberto, pela parceria de vida, companheirismo e despreendimento. Por me acompanhar durante as horas de viagem semanalmente, sempre com uma palavra de força e ânimo. Dizendo que tudo valeria a pena e que a minha conquista é a sua também. Eu te amo!

Aos meus pais, meu infinito agradecimento. Sempre acreditaram em minha capacidade.

Aos meus irmãos, Marcos Paulo e Juliana, não importa a que distância, vocês sempre estão comigo.

Agradeço também a meus cunhados Fillipi e Márcio, as minhas cunhadas Mônica e Karina, aos meus sobrinhos João Henrique, Francisco, Beatriz e Leonardo e a minha sogra, pelo incentivo e apoio. Obrigada pelo carinho!

À Renatinha, que cuida da minha jóia mais preciosa para que eu possa trabalhar e estudar. Obrigada por sua ajuda, parceria e todo o carinho que dedica à minha filha!

À Sílvia, pelo respeito, disponibilidade, humildade, compreensão e pelos sábios conselhos sempre que a procurei para conversar. As suas críticas construtivas, as discussões e reflexões foram fundamentais ao longo de todo o percurso. Você marcou a minha vida!

Aos professores Rodrigo, Leandro e Gustavo pela coorientação.

Aos professores da banca, Lamara e Leandro, por aceitarem o meu convite com carinho.

A amiga Raquel, minha maior incentivadora e por só querer o meu bem.

À Pricila, que aos poucos nos tornamos mais que amigas. Obrigada por dividir comigo as angústias e alegrias e ouvir minhas bobagens. Agradeço os momentos que partilhamos na conquista deste trabalho. Foi bom poder contar com você!

Aos demais amigos, pela coragem que me foram transmitindo.

Aos pacientes voluntários, pela colaboração.

À UFV, que fazem com que me orgulhe tanto de mencionar o nome da Instituição como de pisar em suas instalações.

## RESUMO

BOMFIM, Mariana Souza Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2019. **Perfil oxidativo de pacientes com doença de alzheimer.** Orientadora: Silvia Almeida Cardoso. Coorientadores: Leandro Licursi de Oliveira, Rodrigo de Barros Freitas, Luciana Moreira Lima e Lucas Vilas Boas Magalhães.

A doença de Alzheimer (DA) é a causa mais comum de demência, com alta morbidade e mortalidade, relacionada ao envelhecimento da população. O presente estudo tem como objetivo determinar o perfil oxidativo de pacientes com doença de Alzheimer em comparação à pacientes idosos sem alteração cognitiva. Trinta e oito idosos voluntários foram divididos em dois grupos: um contendo idosos diagnosticados com DA e com pontuação abaixo de 20 pontos no Mini Exame do Estado Mental (MEEN), e outro de indivíduos sem alteração cognitiva. Após a coleta do sangue por punção venosa foi realizada a avaliação hematológica e avaliação do perfil oxidativo. Para tanto foi avaliada a capacidade antioxidante sérica total por redução férrica (FRAP), detecção da atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e da glutathione S transferase (GST) e quantificação dos marcadores de dano relacionados ao estresse oxidativo; peroxidação lipídica (MDA) e proteína carbonilada. Não foi observada diferença significativa no FRAP entre os dois grupos avaliados. A atividade de CAT apresentou-se significativamente menor no grupo com DA, entretanto não foi observado a mesma alteração para as enzimas SOD e GST. A peroxidação lipídica foi significativamente superior no grupo com DA em comparação ao grupo de idosos, a detecção de proteína carbonilada não evidenciou diferença entre os grupos avaliados. Observou correlação inversa entre atividade da enzima antioxidante CAT e MDA, apenas para o grupo de pacientes com a DA. De acordo com os resultados apresentados, podemos concluir que embora não tenha sido observada alteração no FRAP entre os grupos avaliados, a redução da atividade da enzima CAT corrobora com peroxidação lipídica superior no grupo de pacientes com DA. Demonstrando assim que a referida condição altera o perfil oxidativo sérico.

## ABSTRACT

BOMFIM, Mariana Souza Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2019. **Oxidative profile of patients with Alzheimer's disease.** Advisor: Silvia Almeida Cardoso. Co-advisors: Leandro Licursi de Oliveira, Rodrigo de Barros Freitas, Luciana Moreira Lima and Lucas Vilas Boas Magalhães.

Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia, with high morbidity and mortality, related to the aging of the population. The present study aims to determine the oxidative profile of patients with Alzheimer's disease compared to elderly patients without cognitive impairment. Thirty-eight elderly volunteers were divided into two groups: one containing elderly diagnosed with AD and with scores below 20 points in the Mini Mental State Examination (MEEN), and another of individuals without congenital alteration. After the collection of blood by venipuncture, the hematological evaluation and evaluation of the oxidative profile were performed. The total antioxidant capacity by iron reduction (FRAP), detection of the activity of the catalase antioxidant enzymes (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione S transferase (GST) and quantification of damage markers related to oxidative stress; lipid peroxidation (MDA) and carbonylated protein. No significant difference was observed in the FRAP between the two groups evaluated. CAT activity was significantly lower in the AD group, however, the same alteration was not observed for the SOD and GST enzymes. Lipid peroxidation was significantly higher in the AD group compared to the elderly group, the detection of carbonylated protein showed no difference between the groups evaluated. It observed an inverse correlation between activity of the antioxidant enzyme CAT and MDA, only for the group of patients with AD. According to the results presented, we can conclude that, although there was no alteration in FRAP between the groups evaluated, the reduction of the activity of the CAT enzyme corroborates with superior lipid peroxidation in the group of patients with AD. Thus demonstrating that said condition alters the serum oxidative profile.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ATP = Trifosfato de Adenosina  
BHE = Barreira Hematoencefálica  
BSA = Albumina de Soro Bovino  
CDNB = 1-Cloro-2,4-Dinitrobenzeno  
CEP-UFV = Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Viçosa  
COX = Ciclooxigenase  
DA = Doença de Alzheimer  
DEM = Departamento de Enfermagem e Medicina  
DMSO = Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo  
DNA = Ácido Desoxirribonucleico  
DP = Doença de Parkinson  
DSM = Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais  
EDTA = Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético  
ERNs = Espécies Reativas de Nitrogênio  
EROs = Espécies Reativas de Oxigênio  
GSH = Glutationa  
H<sub>3</sub>O<sub>4</sub> = Ácido Fosfórico  
HCL = Ácido Clorídrico  
IBGE = Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística  
IL = Interleucina  
MDA = Malondialdeído  
MEEN = Mini Exame do Estado Mental  
MHC = Complexo de Histocompatibilidade Principal  
MMSE = Mini-Exame do Estado Mental  
NADPH = Hidrogênio Fosfato de Dinucleotídeo de Adenina e Nicotinamida  
NADPH = Taxa de Oxidação  
NFT = Emaranhados Neurofibrilares  
O<sub>2</sub><sup>-</sup> = Superóxido  
PCR = Proteína C Reativa

SNC = Sistema Nervoso Central

SNP = Sistema Nervoso Periférico

SOD = Superóxido Dismutase

TA = Termo de Assentimento

TALE = Termo de Assentimento Livre Esclarecido

TBARS = Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

TCLE = Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TNF = Fator de Necrose Tumoral

UFV = Universidade Federal de Viçosa

## **LISTA DE TABELAS**

Artigo

Tabela 1 – Perfil demográfico dos 38 voluntários em atendimento na Unidade de Atendimento Especializada em Saúde da Universidade Federal de Viçosa/ Minas Gerais.

Tabela 2 – Perfil hematológico dos 38 voluntários em atendimento na Unidade de Atendimento Especializada em Saúde da Universidade Federal de Viçosa/ Minas Gerais.

## LISTA DE FIGURAS

Artigo

Figura 1 – Capacidade antioxidante total sérica. (pág. 16).

Figura 2 – Detecção da atividade enzimática sérica. (pág. 17).

Figura 3 – Quantificação de marcadores de dano tecidual. (pág. 17).

Figura 4 – Dispersão e correlação de Pearson ( $r$ ). (pág. 18).

## APRESENTAÇÃO

A presente dissertação foi elaborada de acordo com as normas estabelecidas pela Pró Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal de Viçosa – UFV. O corpo do trabalho compreende uma introdução geral, objetivo geral e objetivos específicos, um artigo científico e uma conclusão geral. O artigo original foi intitulado “**Oxidative profile of patients with Alzheimer's disease**”, submetido para a revista **Free Radical Biology and Medicine**. (Qualis A1- Medicina I).

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	5
3 OBJETIVOS.....	8
3.1 Objetivo Geral.....	8
3.1.1 Objetivos Específicos.....	8
4 PRODUTO FINAL .....	9
ANEXO A – Aprovação do projeto pelo CEP - UFV.....	25
ANEXO B – Comprovante de submissão do artigo.....	29
ANEXO C – Termo de Assentimento Livre e Esclarecido .....	30
ANEXO D – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	33
ANEXO E – Mini Exame do Estado Mental.....	36

## **1 INTRODUÇÃO GERAL**

### **1.1 Desordens neurodegenerativas**

A neurodegeneração é um fenômeno que ocorre no sistema nervoso central, associado à perda de estrutura e função neuronal. Podendo ser observada após infecções virais, e principalmente em processos patológicos denominados “doenças degenerativas” (Chen et al., 2017).

O sistema nervoso central (SNC) humano adulto consiste em aproximadamente 100 bilhões de neurônios e uma quantidade similar de células da glia, caracterizada por astrócitos, oligodendrócitos e micróglia (Azevedo et al., 2009). O parênquima do SNC está separado do resto do corpo pela barreira hematoencefálica (BH), que é formada predominantemente por junções entre as células endoteliais da vasculatura do SNC. A BH restringe e controla a entrada de nutrientes e células, incluindo células imunológicas periféricas, que estão quase completamente ausentes no SNC saudável. Assim determinando-se o conceito de sítio imunologicamente privilegiado para o SNC. Mais recentemente esse conceito vem sendo modificado a partir de observações sobre a competência imunológica própria do SNC e pela rápida capacidade de responder a lesões e infecções (Amor et al., 2010).

A doença de Alzheimer (DA), esclerose múltipla, doença de Parkinson (DP) e a esclerose lateral amiotrófica que negativamente afetam o funcionamento do SNC central, geralmente são observadas em idosos. (Chen et al., 2017).

### **1.2 Doença de Alzheimer**

A DA é a causa mais comum de demência, com alta morbidade e mortalidade, relacionada ao envelhecimento da população (Rojas-Gutierrez et al., 2017). É responsável por aproximadamente 60 a 70% de todos os casos de demência. Sua prevalência aumenta com a idade, sendo de cerca de 1% no grupo etário de 60 a 64 anos, e de 24 a 33% naqueles com idade superior a 85 anos (Arahamian et al., 2009; Schaeffer et al., 2011).

Em 2011, as estimativas indicavam 24 milhões de pessoas acometidas pela DA no mundo, e prevê-se que, até o ano de 2030, este número atinja 72 milhões. Não existem muitos dados a respeito da incidência da DA no Brasil, entretanto, estima-se que um milhão de pessoas sofram desta doença no país. Existe a necessidade de aprimorar esses dados, pois a DA aparenta ser subdiagnosticada no território brasileiro (Ferri, 2012, Herrera et al., 2002).

O déficit de memória é a apresentação mais comum da doença, que envolve também dificuldade em aprendizagem e recordar informações recentemente aprendidas. Esse sintoma evolui de forma insidiosa e progride lentamente ao longo do tempo. O declínio de outras funções, como a atenção, a linguagem e as funções executivas, pode surgir concomitantemente à alteração de memória ou posteriormente a ela (Mega, 2002; Galluci et al., 2005; Mckhann et al., 2002).

Atualmente, podem ser diferenciadas duas formas de DA: de início tardio e a familiar que por ser de surgimento prematuro, é também chamada de precoce (ocorrendo antes dos 60 anos). A DA familiar apresenta um forte componente genético representando de 1% a 6% de todos os casos de DA. Já a DA tardia é a forma mais comum da doença, sendo caracterizada por ser de advento tardio (após os 60 anos) e possui um arquétipo muito complexo. Ambas as formas da doença são definidas pelas mesmas características patológicas, principalmente o decréscimo das funções cognitivas (Falco et al., 2016).

A fisiopatologia da DA está relacionada com o acúmulo do peptídeo  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ A) derivado da clivagem proteolítica da proteína precursora amiloide (APP) pela ação de beta e gama secretases. Esse acúmulo leva à toxicidade sináptica e à neurotoxicidade, ocasionando a quebra da homeostase do cálcio, a indução de estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial (Blennow et al., 2006; Hauptmann et al., 2006; Karran et al., 2011; Aliev et al., 2013). Em condições normais, o peptídeo  $\beta$ A é degradado por enzimas e retirado do encéfalo através de um balanço entre efluxo e influxo, mediados pela proteína receptora de LDL e receptores para produtos finais de glicosilação avançada. Na DA, um desbalanço entre a produção e o clearance do peptídeo  $\beta$ A levam ao depósito de oligômeros no espaço extracelular, ocasionando inibição do potencial de longa duração hipocampal e da plasticidade sináptica (Blennow et al., 2006; Butterfield et al., 2007; Karran et al., 2011). Estudos revelam também a ocorrência de uma produção excessiva de  $\beta$ A intraneuronal, podendo esta causar lise neuronal e formação de placas senis (Fernandez-Vizarra et al., 2004; Karran et al., 2011). As placas acabam por desencadear ativação astrocítica e microglial e a produção de resposta inflamatória, gerada no entorno dos depósitos de  $\beta$ A, e assim contribuem com a morte de neurônios, com o déficit de neurotransmissores colinérgicos, serotoninérgicos, noradrenérgicos e com a redução dos níveis de somatostatina e corticotropina (Angosto et al., 2009).

Estudos anteriores observaram alterações de propriedades bioquímicas em linfócitos de pacientes com DA, incluindo estresse oxidativo substancial, disfunção mitocondrial e disfunção do ciclo celular. Essas alterações bioquímicas apresentadas nos linfócitos da DA

parecem influenciar suas funções imunológicas fisiológicas. Simultaneamente, as linhas de evidência mostraram redução nos parâmetros hematimétricos e taxas mais altas de hemossedimentação, indicando uma forte associação entre DA e anemia (Faux et al., 2014). A anemia já foi associada à perda cognitiva na DA, mas o mecanismo desse risco é desconhecido (Denny et al., 2006; Chaves et al., 2006).

A certeza do diagnóstico só pode ser obtida por meio do exame microscópico do tecido cerebral do doente após seu falecimento. Na prática, o diagnóstico da Doença de Alzheimer é clínico, isto é, depende da avaliação feita por um médico, que irá definir, a partir de exames e da história do paciente, qual a principal hipótese para a causa da demência. As duas características patológicas, particularmente evidentes nos estágios finais da doença, são placas amilóides e emaranhados neurofibrilares (NFT). Já foi descrito uma forte relação entre a DA e distúrbios metabólicos (síndrome metabólica) e o estresse oxidativo. Sabidamente a dislipidemia e o desequilíbrio da glicemia amplificam a peroxidação lipídica, que gradualmente reduz a capacidade dos sistemas antioxidantes. Causando assim alterações no metabolismo oxidativo que afeta a estrutura celular, podendo ocasionar danos neuronais (Rojas-Gutierrez et al., 2017).

### **1.3 Estresse oxidativo e desordens**

Nas células saudáveis, a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) por NADPH oxidase está diretamente relacionada a eventos de sinalização celular e na manutenção da homeostase dos tecidos, entretanto, a ativação excessiva da NADPH oxidase implicada na degeneração neurológica mediada pelo estresse oxidativo (Gao et al., 2012; Brandes et al., 2014).

A patogênese de distúrbios neurológicos está diretamente relacionada à disfunção mitocondrial. Os neurônios dependem da fosforilação oxidativa para atender às suas necessidades energéticas e, portanto, as alterações na função mitocondrial estão ligadas à falha de energia (formação de ATP) e à morte das células neuronais. A disfunção mitocondrial está relacionada com aumento dos níveis de EROs derivados do vazamento de elétrons da cadeia de transporte de elétrons (Rose et al., 2017).

As espécies reativas de nitrogênio (ERNs) também podem contribuir para estresse oxidativo. Conjuntamente às EROs podem causar oxidação de proteínas, de DNA e a peroxidação lipídica. Tal peroxidação é muito relevante para o SNC devido aos altos índices de ácidos graxos poli-insaturados. Assim sendo, o estresse oxidativo pode causar danos a

membrana celular e comprometer sua integridade e viabilidade (Bandy et al., 1990; Lassmann, 2011).

A intensa atividade metabólica e a regeneração celular restrita contribuem fortemente para a vulnerabilidade do SNC ao estresse oxidativo. O alto número de mitocôndrias ativas acarretam em uma grande quantidade de espécies reativas. Tais níveis podem afetar o funcionamento mitocondrial e atualmente são associados à degeneração axonal e ao comprometimento da viabilidade dos oligodendrócitos visto sua necessidade de manutenção do estado de mielinização, com alta demanda energética (Morató et al., 2014).

O dano mitocondrial pode iniciar a apoptose por liberação de citocromo C e fatores pro apoptóticos (Kuwana et al., 2003). A renovação de proteínas não funcionais e organelas é especialmente importante em células neuronais devido a sua baixíssima taxa neurogênica. Esses danos são mais comuns com o envelhecimento, o que propicia um maior risco ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas com o aumento da idade (Mecocci et al., 1993; Montine et al., 2002).

Frente ao apresentado nosso grupo de pesquisa vem atuando na avaliação do perfil oxidativo de pacientes previamente diagnosticados com doença de Alzheimer. Visando um aprofundamento no conhecimento do perfil oxidativo destes pacientes, para possibilitar articulações e intervenções necessárias com objetivo de minimizar as repercussões das referidas condições crônicas não transmissíveis.

## 2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMOR, S.; PUENTES, F.; BAKER, D.; VAN DER VALK, P. Inflammation in neurodegenerative diseases. **Immunology**. v. 129, n. 2, p. 154-169, 2010.

ALIEV, G.; OBRENOVICH, M. E.; TABREZ, S.; JABIR, N. R.; REDDY, V. P.; LI, Y.; BURNSTOCK, G.; CACABELOS, R.; KAMAL, M. A. Link between Cancer and Alzheimer Disease via Oxidative Stress Induced by Nitric Oxide-Dependent Mitochondrial DNA Over proliferation and Deletion. **Oxid. Med. Cell. Longev**. p. 962-984, 2013.

ANGOSTO, M. C.; GONZÁLEZ, P. G. Factores implicados en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer. Estrés oxidativo. **Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia**. Madrid. p. 417-466, 2009.

APRAHAMIAN, I.; MARTINELLI, J. E.; YASSUDA, M. S. Alzheimer's disease: an epidemiology and diagnosis review. **Rev. Bras. Clin. Med.** v. 7, p. 27-35, 2009.

AZEVEDO, F. A. C.; CARVALHO, L. R.; GRINBERG, L. T.; FARFEL, J. M.; FERRETTI, R. E.; LEITE, R. E.; JACOB FILHO, W.; LENT, R.; HERCULANO-HOUZEL, S. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. **Journal of Comparative Neurology**. v. 513, n. 5, p. 532–541, 2009.

BANDY, B.; DAVISON, A. J. Mitochondrial mutations may increase oxidative stress: Implications for carcinogenesis and aging? **Free Radical Biology and Medicine**. v. 8, p. 523-539, 1990.

BLENNOW, K.; DE LEON, M. J.; ZETTERBERG, H. Alzheimer's disease. **Lancet**. v. 368, p. 387-403, 2006.

BRANDES, R. P.; WEISSMANN, N.; SCHRODER, K. Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation', **Free Radical Biology and Medicine**. v. 76, p. 208-226, 2014.

BUTTERFIELD, D. A.; REED, T.; NEWMAN, F. S.; SULTANA, R. Roles of amyloid beta-peptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 43, p. 658-677, 2007.

CHAVES, P. H.; CARLSON, M. C.; FERRUCCI, L.; GURALNIK, J. M.; SERBA, R.; FRIED, L. P. Associação entre anemia leve e comprometimento da função executiva em mulheres idosas da comunidade: o Estudo de Saúde e Envelhecimento da Mulher II. **J Am Geriatr Soc**. v. 54, p. 1429-1435, 2006.

CHEN, S. H.; BU, X. L.; JIN, W. S.; SHEN, L. L.; WANG, J.; ZHUANG, Z. Q.; ZHANG, T.; ZENG, F.; YAO, X. Q.; ZHOU, H. D.; WANG, Y. J. Altered peripheral profile of blood cells in Alzheimer disease: A hospital-based case-control study. **Medicine**. v. 96, n. 21, p. 1–7, 2017.

DENNY, S. D.; KUCHIBHATLA, M. N.; COHEN, H. J. Impact of anemia on mortality, cognition, and function in community-dwelling elderly. **Am J Med.** v. 119, p. 327-334, 2006.

FALCO, A.; CUKIERMAN, D. S.; HAUSER-DAVIS, R.A.; REY, N.A. Doença de Alzheimer: Hipóteses Etiológicas e Perspectivas de Tratamento, **Quim. Nova.** vol.39, nº 1, 63-80, 2016.

FAUX, N. G.; REMBACH, A.; WILEY, J.; ELLIS, K. A.; AMES, D.; FOWLER, C. J.; MARTINS, R. N.; PERTILE, K. K.; RUMBLE, R. L.; TROUNSON, B.; MASTERS, C. L.; AIBL RESEARCH GROUP; BUSH, A. I. An anemia of Alzheimer's disease. **Mol Psychiatry.** v. 19, p. 1227-1234, 2014.

FERNANDEZ-VIZARRA, P.; FERNANDEZ, A. P.; CASTRO-BLANCO, S.; SERRANO, J.; BENTURA, M. L.; MARTINEZ-MURILLO, R.; MARTINEZ, A.; RODRIGO, J. Intra- and extracellular Abeta and PHF in clinically evaluated cases of Alzheimer's disease. **Histol. Histopathol.** v. 19, p. 823-844, 2004.

FERRI, C. P. **Revista Brasileira de Psiquiatria.** v. 34, p.371, 2012.

GALLUCCI, N. J.; TAMELINI, M. G.; FORLENZA, O. V. Diagnóstico Diferencial das Demências. **Rev. Psiq. Clín.,** v. 32, p. 119-130, 2005.

GAO, H. M.; ZHOU, H.; HONG, J. S. NADPH oxidases: novel therapeutic targets for neurodegenerative diseases. **Trends in Pharmacological Sciences.** v. 33, p. 295–303, 2012.

HAUPTMANN, S.; KEIL, U.; SCHERPING, I.; BONERT, A.; ECKERT, A.; MULLER, W. E. Mitochondrial dysfunction in sporadic and genetic Alzheimer's disease. **Exp. Gerontol.** v. 41, p. 668-673, 2006.

HERRERA, E.; CARAMELLI, P.; SILVEIRA, A. S.; NITRINI, R. Epidemiologic survey of dementia in a community-dwelling Brazilian population. **Alzheimer Dis. Assoc. Disord.** v. 16, p. 103-108, 2002.

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.** v. 10, p. 698-712, 2011.

KUWANA, T.; NEWMAYER, D. D. Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. **Current Opinion in Cell Biology.** v. 15, p. 691-699, 2003.

LASSMANN, H. Mechanisms of neurodegeneration shared between multiple sclerosis and Alzheimer's disease', **Journal of Neural Transmission.** v.118 p. 747-752, 2011.

MCKHANN, G.M.; KNOPMAN, D.S.; CHERTKOW, H.; HYMAN, B.T.; JACK, C.R.; KAWAS, C.H.; KLUNK, W.E.; KOROSHETZ, W.J.; MANLY, J.J.; MAYEUX, R.; MOHS, R.C.; MORRIS, J.C.; ROSSOR, M.N.; SCHELTENS, P.; CARRILLO, M.C.; THIES, B.; WEINTRAUB, S.; MEGA, M. S. Differential diagnosis of dementia: clinical examination and laboratory assessment. **Clin. Cornerstone,** v. 4, p. 53-65, 2002.

MECOCCI, P.; MACGARVEY, U.; KAUFMAN, A. E.; KOONTZ, D.; SHOFFNER, J. M.; WALLACE, D. C. Oxidative damage to mitochondrial DNA shows marked age-dependent increases in human brain', **Annals of Neurology.** v. 34, p. 609-616, 1993.

MEGA, M. S. Differential diagnosis of dementia: clinical examination and laboratory assessment. **Clin. Cornerstone**, v. 4, p. 53-65, 2002.

MONTINE, T. J.; NEELY, M. D.; QUINN, J. F.; BEAL, M. F.; MARKESBERY, W. R.; ROBERTS, L. J.; MORROW, J. D. Lipid peroxidation in ageing brain and Alzheimer's disease. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 33, p. 620-626, 2002.

MORATÓ, L.; BERTINI, E.; VERRIGNI, D.; ARDISSONE, A.; RUIZ, M.; FERRER, I.; UZIEL, G.; PUJOL, A. Mitochondrial dysfunction in central nervous system white matter disorders. **Glia**. v. 62, p. 1878-1894, 2014.

ROJAS-GUTIERREZ, E.; MUÑOZ-ARENAS, G.; TREVIÑO, S.; ESPINOSA, B.; CHAVEZ, R.; ROJAS, K.; FLORES, G.; DÍAZ, A.; GUEVARA, J. Alzheimer's disease and metabolic syndrome: A link from oxidative stress and inflammation to neurodegeneration. **Synapse**. 2017.

ROSE, J.; BRIAN, C.; WOODS, J.; PAPPAS, A.; PANAYIOTIDIS, M. I.; POWERS, R.; FRANCO, R. Mitochondrial Dysfunction in Glial Cells: Implications for Neuronal Homeostasis and Survival', **Toxicology**. v. 391, p. 109-115, 2017.

SCHAEFFER, E. L.; FIGUEIRÓ, M.; GATTAZ, W. F. Insights into Alzheimer disease pathogenesis from studies in transgenic animal models. **Clinics**. v. 66, p. 45-54, 2011.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Determinar o perfil oxidativo de pacientes com doença de Alzheimer em comparação à pacientes idosos sem alteração cognitiva.

##### 3.1.1 Objetivos Específicos

- Listar os pacientes idosos atendidos no serviço de referência;
- Categorizar os pacientes idosos atendidos no serviço especializado de saúde de Viçosa/MG;
- Analisar o perfil hematológico;
- Avaliar a capacidade antioxidante sérica total, por redução férrica (FRAP);
- Avaliar a atividade sérica de catalase (CAT);
- Quantificar o marcador MDA resultante da peroxidação lipídica.
- Correlacionar a atividade da enzima antioxidante e catalase (CAT) e a peroxidação lipídica (MDA).

## 4 PRODUTO FINAL

### 4.1 Artigo Original

#### **Oxidative profile of patients with Alzheimer's disease.**

Mariana Souza Silva Bomfim<sup>a</sup>, Rodrigo de Barros Freitas<sup>a</sup>, Lucas Vilas Boas Magalhães<sup>a</sup>, Leandro Licursi de Oliveira<sup>b</sup>, Silvia Almeida Cardoso<sup>a</sup>.

a Postgraduate Program Professional Master in Health Sciences, Department of Medicine and Nursing. Federal University of Viçosa – Minas Gerais – Brazil.

b Postgraduate Program in Cell and Structural Biology, Department of General Biology. Federal University of Viçosa - Minas Gerais – Brazil.

\*Corresponding author: Silvia Almeida Cardoso, Phd, Departamento de Medicina e Enfermagem, Universidade Federal de Viçosa. 36570-900 - Viçosa, Brazil. E-mail: [silvia.cardoso@ufv.br](mailto:silvia.cardoso@ufv.br)

#### **RESUMO**

**Introdução:** A doença de Alzheimer (DA) torna-se cada vez mais incidente na população idosa mundial, sendo caracterizada como uma alteração no parênquima cerebral de seus portadores. O estresse oxidativo apresenta-se como um agente integrante na fisiopatologia da DA podendo resultar em danos a membranas celulares e assim comprometendo sua integridade e viabilidade. **Objetivo:** Comparar o perfil oxidativo de idosos portadores de DA com idosos sem alteração cognitiva. **Material e métodos:** Pesquisa realizada com 38 voluntários em atendimento na Unidade de Atendimento Especializada em Saúde da Universidade Federal de Viçosa/Minas Gerais, sendo 20 voluntários com diagnóstico prévio de DA e 18 idosos sem alteração cognitiva. Foram realizadas análises hematológicas, para definição do hemograma e leucograma. A partir do soro foram realizadas avaliações da capacidade antioxidante total (FRAP), determinação da atividade das enzimas Catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e Glutathione-S-transferase (GST) e quantificação dos marcadores de dano proteínas carboniladas e produto de lipoperoxidação (MDA). **Resultados:** Observou-se alterações significativas hematológicas que evidenciaram no grupo DA níveis reduzidos de linfócitos e aumentados de neutrófilos, resultando em maior relação

neutrófilo- linfócito (RN/L) em comparação aos idosos sem alteração cognitiva. Assim como níveis hemantiométricos inferiores. Não foi observado alteração nas detecções de FRAP, SOD e GST entre os dois grupos avaliados, entretanto a atividade da enzima CAT apresentou-se significativamente reduzida no grupo DA. Apenas o marcador MDA apresentou-se significativamente maior no grupo DA, apresentando correlação inversa com as dosagens de CAT para o grupo em questão. **Conclusão:** Nossos achados demonstram que os pacientes com DA embora não apresentem alteração na capacidade antioxidante sérica total, apresentam alterações no padrão enzimático antioxidante assim como no marcador relacionado a lipoperoxidação. Achados importantes para estabelecimentos de condutas preventivas para esse grupo de pacientes.

Palavras chave: Doença de Alzheimer, estresse oxidativo, neurodegeneração.

## **ABSTRACT**

**Introduction:** Alzheimer's disease (AD) has become increasingly incident in the elderly population worldwide, being characterized as a change in the brain parenchyma of its patients. The oxidative stress presents itself as an integral agent in the pathophysiology of AD and may result in damage to cell membranes, thus compromising their integrity and viability. **Objective:** To compare the oxidative profile of AD elderly patients with the elderly without cognitive impairment. **Material and Methods:** Research carried out with 38 volunteers under medical care at a Specialized Healthcare Unit at the Federal University of Viçosa/Minas Gerais, being 20 elderly volunteers with prior AD diagnosis and 18 elderly people without cognitive impairment. Hematological analyses were performed to define the Complete Blood Count (CBC) and Leukocyte Differential Count (LDC). From serum were made evaluations of the Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP), determination of the activity of the Catalase enzymes (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione-S-transferase (GST) and quantification of damage markers of carbonylated proteins and product of lipid peroxidation (Malondialdehyde - MDA). **Results:** There were significant hematological changes that evidenced, in the AD group, reduced levels of lymphocytes and increased neutrophils, resulting in increased neutrophil-lymphocyte ratio (RN/L) in comparison to the elderly without cognitive impairment, as well as lower hematimetric levels. There was no alteration in detections of FRAP, SOD and GST activities between the two groups evaluated, however the CAT enzyme activity was significantly decreased in the AD group. Only the MDA marker was significantly higher in the AD group, presenting an inverse correlation with

CAT dosages for the group in question. **Conclusion:** Our findings show that AD patients do not present alterations in the FRAP, present alterations in antioxidant enzyme pattern as well as in the marker related to lipoperoxidation. Important findings to establish preventive measures for this group of patients.

**Keywords:** Alzheimer Disease, oxidative stress, neurodegeneration.

## INTRODUCTION

AD is the most common cause of neurodegenerative dementia, with high morbidity and mortality related to the population aging (Rojas-Gutierrez et al., 2017). Its most common presentation is the cognitive deficit, which involves difficulty in learning and evocation of information recently learned. This symptom develops insidiously and progresses slowly over time. The decline of other functions, such as attention, language and executive functions, can occur concomitantly with or subsequently to the amendment of memory (Mega, 2002; Galluci et al., 2005; Mckhann et al., 2002).

The pathophysiology of AD is related to the hyperphosphorylation of the TAU protein and the extracellular accumulation of  $\beta$ -amyloid peptide ( $\beta$ A) derived from the proteolytic cleavage of the Amyloid Precursor Protein (APP), by the action of beta and gamma secretases. This accumulation leads to synaptic toxicity and neurotoxicity, causing the breakage of calcium homeostasis, the induction of oxidative stress and mitochondrial dysfunction (Blennow et al., 2006; Hauptmann et al., 2006; Karran et al., 2011; Aliev et al., 2013).

Several evidences demonstrate the participation of systemic inflammation in the progression of the AD (Fulop et al., 1990; Scali et al., 2002; Jaremo et al., 2011). Peripheral leukocytes present functional alterations in patients with AD (Song et al., 1999), with increased oxidative stress in lymphocytes, corroborating to the progression of the disease (Sultana et al., 2013). Other cellular alterations have already been reported in this condition, peptides ( $\beta$ A) have already been observed in phagocytic granules of neutrophils (Davydova et al., 2003; Fiala et al., 2005). Hematological alterations have also been reported in patients with AD, with anemia associated with a two times higher risk of developing AD. Low levels of hemoglobin may affect cognitive impairment of the AD patient, due to reduced cerebral blood oxygen levels during a prolonged period of time (Shah et al., 2008; Winchester et al., 2018).

Therefore, our group has been adding efforts in the attempt to assess the systemic oxidative profile of patients with AD. With the objective of deepening the knowledge of the oxidative profile of these patients, to enable necessary joints and interventions in order to minimize the impact of noncommunicable chronic conditions.

## **METHODOLOGY**

### **Study design**

The study participants were 38 volunteers under medical care at the Specialized Healthcare Unit at the Federal University of Viçosa/Minas Gerais. The samples were carried out in the period from April to September 2018, after approval by the Human Research Ethics Committee at the Federal University of Viçosa (CEP-UFV), opinion number 2.541.609.

The sample included elderly individuals of both sexes, with ages greater than or equal to 60 years, capable volunteers signed the informed consent form; the legal guardian of patients with dementia were responsible for signing the informed consent form. Volunteers who refused to participate in the study, or with previous diagnosis of vascular dementia, by HIV, neurosyphilis or multiple infarctions, were excluded.

The subjects were divided into two groups: the first called "elderly" composed of elderly people without cognitive changes and the second called "AD" composed of elderly patients diagnosed with AD and with scores below 20 points in the Mini Mental State Examination (MMSE).

### **Biological sample collection**

The blood sample was collected by venipuncture, being carried out by duly qualified professional. Two blood test tubes were collected, one with anticoagulant for complete blood count and leukocyte differential count analysis by impedance and a second tube without anticoagulant to obtain the serum. After clot retraction, the sample was centrifuged and the serum was stored at  $-4^{\circ}\text{C}$  for later analyses.

### **Assessment of markers of oxidative stress**

#### **Serum total antioxidant power**

The quantification of serum total antioxidant power was based on the method of ferric reducing antioxidant power (FRAP) (Benzie et al., 1996). For this, 10  $\mu\text{l}$  of sample/standard were added to 220  $\mu\text{l}$  of FRAP solution in polystyrene microplates, which were incubated in the dark for 30 minutes. As oxidizing agent was used a Trolox solution, starting with a

concentration of  $2 \text{ mmol.l}^{-1}$ . The readings were performed in a spectrophotometer Multiskan GO Microplate Spectrophotometer (Thermo Scientific) at wavelength of 570 nm. The relative concentrations were obtained from the standard curve and the results were expressed in  $\mu\text{M}$ .

### **Activity of antioxidant enzymes**

#### **Superoxide Dismutase (SOD)**

The determination of the catalytic activity of SOD was performed through the pyrogallol method based on the ability of the enzyme to catalyze the reaction of superoxide (O<sup>-2</sup>) and hydrogen peroxide, according to Sarban and colleagues (2005). For this reason, 30  $\mu\text{l}$  of sample were added to 99  $\mu\text{l}$  of phosphate buffer (0.1M pH 7.0), 6  $\mu\text{l}$  of MTT (1.25 mm) and 15  $\mu\text{l}$  of pyrogallol (100  $\mu\text{M}$ ) in 96-well plate and incubated for 5 minutes at 37°C. The standard and the white were done in the same way, but for both without sample and using 129  $\mu\text{l}$  and 144  $\mu\text{l}$  of buffer, respectively. The white did not receive pyrogallol. After incubation, the reaction was established with 150  $\mu\text{l}$  of DMSO (1.25 mm) and the samples were submitted to reading at 570 nm in the plate reader (Thermo Scientific Multiskan TM GO). The enzymatic activity was expressed in SOD Units/mg of protein.

#### **Catalase (CAT)**

The catalase enzyme activity was evaluated by measuring the kinetics of decomposition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, according to Aebi (1984). For this reason, 6  $\mu\text{l}$  of sample along with 600  $\mu\text{l}$  of phosphate buffer (0.1 M and pH 7.0) were used as white for each sample, whereas, for reading, the phosphate buffer was added to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%). Thus, in a quartz cuvette, the samples were subjected to reading at 240 nm on a spectrophotometer, during 60 seconds, for monitoring of enzyme kinetics. The enzymatic activity was expressed in Catalase Units/mg of protein.

#### **Glutathione-S-Transferase (GST)**

In the determination of enzymatic activity of Glutathione-S-Transferase in the serum of volunteers was held the quantification of the product formed from the complexation of reduced glutathione (GSH) with 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) according to the method described by Habig and colleagues (1974) and was calculated by the rate of oxidation of NADPH. Thus, in a quartz cuvette were pipetted 682  $\mu\text{l}$  of phosphate buffer (0.1 M and pH 7.0) with 6  $\mu\text{l}$  of CDNB (0.1 M), 6  $\mu\text{l}$  of sample and 6  $\mu\text{l}$  of GSH solution (0.1 M) and the reaction rate of the enzyme present in the samples was monitored at 340 nm on a

spectrophotometer, during 90 seconds, for monitoring of enzyme kinetics. Moreover, a white was performed for the experiment, which does not have the addition of sample and was used to check the rate of non-enzymatic reactions. The enzymatic activity was expressed as  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ , where a unit of activity represents the amount of enzyme that catalyzes the formation of 1  $\mu\text{mol}$  of product by minute by gram of sample, under the test conditions.

### **Markers of damage**

#### **Lipid Peroxidation (MDA)**

To quantify the products of lipid peroxidation (lipid peroxides, malondialdehydes and other aldehydes of low molecular weight), serum samples were submitted to the reaction with the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), according to the methodology of Buege and Aust (1978). In this way, 200  $\mu\text{l}$  of each sample were added to 400  $\mu\text{l}$  of solution of TBARS (15% of TCA, 0.375% of TBA and 0.25M of HCL), agitated on a vortex mixer for 10 seconds and placed in a water bath at 90°C during 40 minutes. Then, after cooling, the thiobarbituric acid reactive substances was extracted, with the addition of 600  $\mu\text{l}$  of n-butanol, followed by centrifugation at 3500 rpm for 5 minutes. Finally, after centrifugation, 200  $\mu\text{l}$  of supernatant was carefully removed and submitted to reading at 535 nm. The values of TBARS were expressed in  $\eta\text{mols}$  of malondialdehyde (MDA) by mg of protein.

#### **Carbonylated Proteins (PC)**

The dosage of carbonylated proteins in serum was determined according to the methodology of Levine and colleagues (1990). In this way, the precipitate obtained by centrifugation was re-suspended with 1 ml of phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0) and this divided into two eppendorfs (samples and white), with 500  $\mu\text{l}$  each. Then, both were precipitated with 500  $\mu\text{l}$  of TCA 10% solution and centrifuged at 5000 g for 10 minutes at 4°C and the supernatant, discarded. Subsequently, only the samples were incubated at ambient temperature for 30 minutes, with 500  $\mu\text{l}$  of solution containing 2,4-dinitrophenylhydrazine 10mM 18 and 2M HCL. Soon after, the samples and the whites were again precipitated with TCA 10% and centrifuged for 10 minutes at 5000 g. The precipitate was then washed twice with ethanol solution: ethyl acetate (1: 1), and centrifuged at 10000 g for 10 minutes at 4°C and the supernatant, discarded. Finally, the precipitate obtained was re-suspended in 1 ml of 6% SDS solution, again centrifuged at 10000 g for 10 minutes at 4°C and 200  $\mu\text{l}$  of supernatant were carefully removed and submitted to reading at 370 nm in the plate reader

(Thermo Scientific-Multiskan™ GO). The content of protein was expressed in  $\eta\text{mol}$  of carbonylated proteins by ml of sample.

### Statistical analysis

The analyzed variables presented a normal distribution on the Shapiro-Wilk test, thus the parametric T test was performed. The results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation, with statistical significance considered when  $p < 0.05$ . For the analysis of correlation between the variables, Pearson test was performed. The statistical analysis was performed using the software GraphPad Prism 7.0 program (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

## RESULTS

The present study included 38 volunteers, divided into two groups: 20 elderly patients with a mean age of  $83.7 \pm 5.76$  years with Alzheimer's disease (named AD) and 18 elderly patients with a mean age of  $80.5 \pm 5.76$  years without cognitive impairment (called elderly).

Table 1: Characterization of the studied population, Viçosa-MG.

	Number of volunteers		Age mean $\pm$ SD	
	AD	Elderly	AD	Elderly
Female	18	12	$83.5 \pm 5.89$	$82.6 \pm 9.55$
Male	2	6	$86.5 \pm 4.94$	$75 \pm 10.50$
Total	20	18	$83.7 \pm 5.76$	$80.5 \pm 5.76$

SD: standard deviation.

As shown in table 2, the hematological evaluation showed significant lower quantification of lymphocytes in elderly patients with AD ( $2.5 \pm 2.2 \times 10^3/l$  vs  $3.5 \pm 1.02 \times 10^3/l$ ;  $p = 0.004$ ), in comparison to the elderly without cognitive impairment. Furthermore, the group showed significantly higher quantification of neutrophils ( $6.4 \pm 1.09 \times 10^3$  vs  $5.6 \pm 0.99 \times 10^3$ ;  $p = 0.018$ ). The hematimetric analysis revealed significantly lower levels of hemoglobin ( $12.0 \pm 1.21$  vs  $13.6 \pm 2.02 \text{g/dl}$ ;  $p = 0.0061$ ) and hematocrit ( $36.7 \pm 3.82\%$  vs  $40.9 \pm 6.15\%$ ;  $p = 0.0154$ ) in the AD group in comparison to the elderly group. The neutrophil/lymphocyte ratio of patients with AD showed to be higher in the group of elderly patients without cognitive impairment.

Table 2 – Hematological profile of volunteers, Viçosa-MG.

	AD (n=24)	Elderly(n=18)	<i>p</i> -value <sup>b</sup>
	Mean ± SD	Mean ± SD	
Leukocytes (10 <sup>3</sup> )	8.4 ± 3.08	7.9 ± 2.78	0.635
Lymphocytes (10 <sup>3</sup> )	2.5 ± 2.20	3.5 ± 1.02	<b>0.004</b>
Neutrophils (10 <sup>3</sup> )	6.4 ± 1.09	5.6 ± 0.99	<b>0.018</b>
Eosinophil (10 <sup>3</sup> )	0.3 ± 0.29	0.2 ± 0.10	0.860
Erythrocytes (10 <sup>3</sup> )	42.1 ± 4.92	45.7 ± 7.20	0.063
Hemoglobin (g/dl)	12.0 ± 1.21	13.6 ± 2.02	<b>0.006</b>
Hematocrit (%)	36.7 ± 3.82	40.9 ± 6.15	<b>0.015</b>
Platelet (10 <sup>3</sup> )	230.3 ± 67.46	204.2 ± 51.05	0.162
NLR <sup>a</sup>	2.51	1.59	

<sup>a</sup> Neutrophil/Lymphocyte ratio; <sup>b</sup> bold values have statistical significance

For the evaluation of the serum oxidative profile of the elderly, initially, the total antioxidant power was determined by ferric reducing antioxidant power (FRAP). As shown in Figure 1, there was no difference in serum total antioxidant power between the groups evaluated.

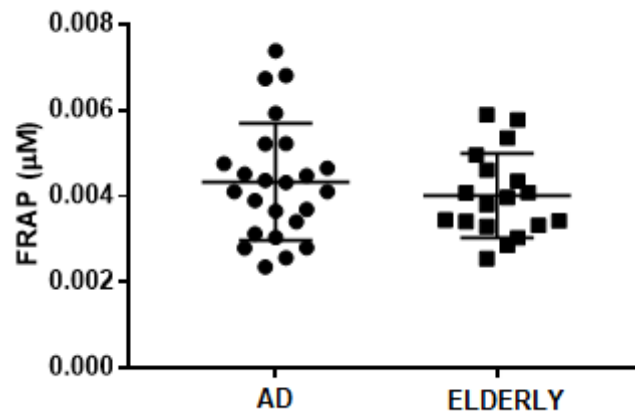


Figure 1: Serum total antioxidant power. Evaluation of the ferric reducing antioxidant power (FRAP) in volunteers with Alzheimer disease (n=20) and the elderly (n=18).

In the evaluation of enzymatic antioxidant activity, the serum activity of catalase (A) is significantly lower in the group with AD compared to the group of the elderly without cognitive impairment. The activities of the enzymes superoxide dismutase (B) and Glutathione-S-transferase (C) showed no difference between the two groups evaluated.

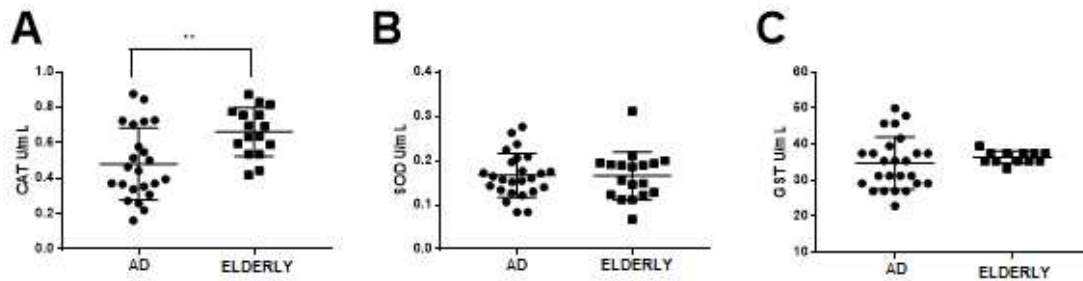


Figure 2: Detection of serum enzyme activity. Evaluation of Catalase (A), Superoxide dismutase (B) and Glutathione S transferases (C) in the serum of volunteers with Alzheimer disease (n=20) and the elderly (n=18). \*\* p<0.01 T test.

In relation to markers of tissue damage resulting from oxidative stress, lipid peroxidation and carbonylated protein were quantified. The MDA marker resulting from lipid peroxidation was significantly higher in the group with Alzheimer disease in comparison to the group of the elderly. There was no change in the carbonylated protein between the groups evaluated.

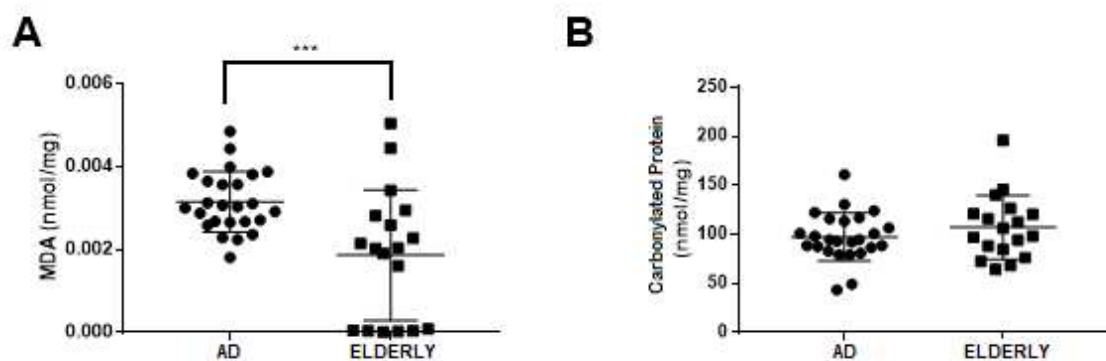


Figure 3: Quantification of markers of tissue damage. Evaluation of lipid peroxidation determined by MDA (A) and carbonylated proteins (B), in volunteers with Alzheimer disease (n=20) and the elderly (n=18). \*\*\* p<0.005 T test.

The correlation between the aforementioned variables was evaluated, showing an inverse correlation between antioxidant enzyme activity and catalase (CAT) and lipid peroxidation (MDA), only for the group of patients with Alzheimer's disease (AD).

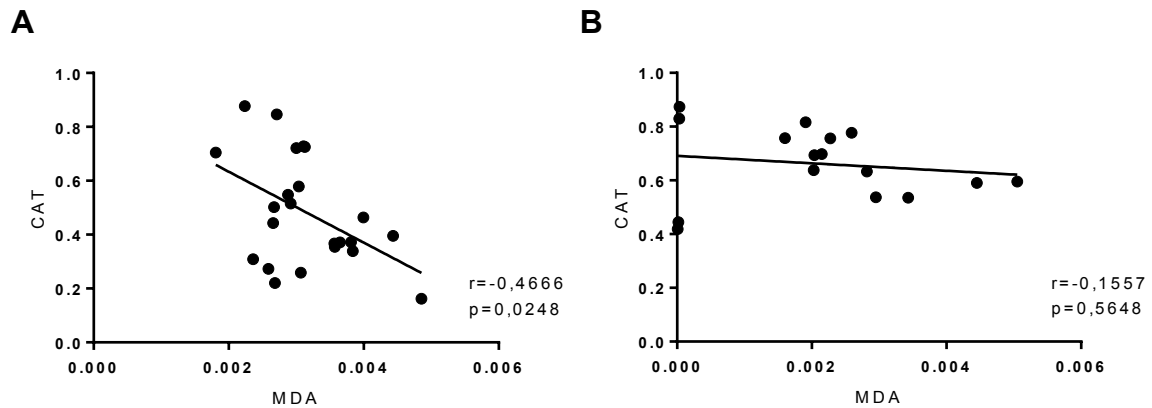


Figure 4: Dispersion and Pearson's correlation coefficient (r). CAT/MDA variables in volunteers with Alzheimer disease (A) and the elderly (B). Statistically significant  $p < 0.05$ .

## DISCUSSION

AD is a chronic neurodegenerative disorder, with dementia as the main consequence. The disease is among the leading medical concerns of the modern world, because only symptomatic therapies are available and there are no reliable, easy-access biomarkers for early detection and monitoring of AD (Mietelska-Porowska et al., 2017).

The incidence of AD is higher in elderly females in relation to males. This fact cannot be attributed only to the greater longevity of women, once higher rates of obesity and diabetes also represent risk factors for dementia. Added to these factors, mitochondria of elderly women undergo changes, becoming more prone to damage related to toxicity of  $\beta$ -amyloid peptides, by reduced estrogen protective action (Viña et al., 2010). In the present study, we recruited elderly volunteers met at a specialized healthcare service of Viçosa/MG and region. The study volunteers with AD diagnosis are mostly females, corroborating the description of the incidence in the literature. The elderly control group, without cognitive impairment, also presented a higher proportion of individuals of the female sex, with a mean age similar to the AD group.

In the present study, we demonstrated that patients with AD showed significant changes in blood cell profile, with emphasis on reduced lymphocytes and increased

neutrophils in relation to the elderly control group. The neutrophil/lymphocyte ratio (RN/L) of patients with AD is larger than the group of the elderly without cognitive impairment, which is similar to that found by Kuyumcu et al. in 2012. The increased RN/L found corroborates studies that demonstrate AD as the result of a chronic inflammatory process. Thus, a low lymphocyte count demonstrates a considerably reduced body resistance to fight an infection, whereas increased neutrophils contribute to changing the BHE permeability (Shah et al., 2009, Winchester et al., 2018).

There was also reduction in hematimetric parameters in the group of patients with AD; reduced levels of hemoglobin are associated to cognitive impairment in AD (Faux et al., 2014). The anemia and the deregulation of iron are associated with increased oxidative stress in the brain; the free iron catalyzes the conversion of hydrogen peroxide into highly reactive hydroxyl radicals. As well as in the lipid peroxidation, resulting in other potentially toxic radicals, which provides the generation of a vicious cycle of degenerative events (Gutteridge, 1982).

Oxidative stress is characterized as an imbalance between the production of reactive species and the antioxidant system in aerobic organisms (Vasconcelos, 2007). The membranes are present in the cells and cell organelles are composed of poly-unsaturated fatty acids, the component most attacked by reactive oxygen species (ROSs), which can induce lipid peroxidation and generation of various molecules typically electrophilic, such as the MDA. This process can cause a modulation of metabolic pathways, which result in destruction and failure of cellular metabolism (Lima et al., 2001, Monteiro, 2007).

Our data demonstrate that the serum total antioxidant power (FRAP) is similar between the AD group and the elderly without cognitive impairment, corroborating the findings of Pulido et al. 2005, who also found no difference in serum antioxidant power between patients with AD and the control group. In the study conducted by Pulido (2005), significantly reduced FRAP values were found only for patients with AD with ApoE4 genotype.

Although compensatory mechanisms in response to the increased production of free radicals are involved especially in the initial stages of AD, these become less efficient with the progression of the disease. This aspect of our study coincided with the research that showed significant reductions in the levels of CAT in blood samples from patients with advanced AD (Klugman et al., 2012; Tabet et al., 2002).

Among the markers of damage related to oxidative stress, we demonstrated that MDA marker resulting from lipid peroxidation (LPO) was significantly higher in the group with

AD. The LPO is a cytotoxic event that triggers a sequence of lesions in the cell. The changes in the membranes lead to disorders of permeability, changing the ionic flow and the flow of other substances, which results in the loss of selectivity for input and/or output of nutrients and toxic substances into the cell, changes in the DNA, oxidation of LDL and impairment of extracellular matrix components (Vaca et al., 1988; Baber et al., 1994). Our results also show an inverse correlation between the levels of CAT and the MDA marker only for the group of patients with AD.

Various modifiable factors have been associated with dementia, such as hypertension, dyslipidemia, obesity in mid-age, diabetes mellitus, smoking, physical inactivity, depression and low levels of schooling (Kivipelto et al., 2018). Our findings substantiate the importance of antioxidant mechanisms in neurodegenerative conditions like AD, thus reinforcing the importance of the enzymatic antioxidant protective effect, for patients in this condition.

## REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**. v. 105, p. 121-126, 1984.
- ALIEV, G.; OBRENOVICH, M. E.; TABREZ, S.; JABIR, N. R.; REDDY, V. P.; LI, Y.; BURNSTOCK, G.; CACABELOS, R.; KAMAL, M. A. Link between Cancer and Alzheimer Disease via Oxidative Stress Induced by Nitric Oxide-Dependent Mitochondrial DNA Over proliferation and Deletion. **Oxid. Med. Cell. Longev.** p. 962-984, 2013.
- BENZIE, I.; STRAIN, J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power: The FRAP Assay". **Analytical Biochemistry**. p. 70-76, 1996.
- BLENNOW, K.; DE LEON, M. J.; ZETTERBERG, H. Alzheimer's disease. **Lancet**. v. 368, p. 387-403, 2006.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**. v. 52, p. 302-310, 1978.
- DAVYDOVA, T. V.; FOMINA, V. G.; VOSKRESENSKAYA, N. I.; DORONINA, O. A. Phagocytic Activity and State of Bactericidal Systems in Polymorphonuclear Leukocytes from Patients with Alzheimer's Disease. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**. v. 136, p. 355-357, 2003.
- FAUX, N. G.; REMBACH, A.; WILEY, J.; ELLIS, K. A.; AMES, D.; FOWLER, C. J.; MARTINS, R. N.; PERTILE, K. K.; RUMBLE, R. L.; TROUNSON, B.; MASTERS, C. L.; AIBL RESEARCH GROUP; BUSH, A. I. An anemia of Alzheimer's disease. **Mol Psychiatry**. v. 19, p. 1227-1234, 2014.
- FIALA, M.; LIN, J.; RINGMAN, J.; KERMANI-ARAB, V.; TSAO, G.; PATEL, A.; LOSSINSKY, A. S. D.; GRAVES, M. C. B.; GUSTAVSON, A.; SAYRE, J.; SOFRONI, E.; SUAREZ, T.; CHIAPPELLI, F.; BERNARD, G. Ineffective phagocytosis of amyloid- $\beta$  by macrophages of Alzheimer's disease patients. **Journal of Alzheimer's Disease**. v. 7, p. 221-232, 2005.
- FULOP, T. JR.; KEKESY, D.; FORISA, G. Altered post-receptorial signal transduction mechanism under various stimulation in polymorphonuclear granulocytes of Alzheimer's disease. **Mechanisms of Ageing and Development**. v. 52, p. 277-285, 1990.
- GALLUCCI, N. J.; TAMELINI, M. G.; FORLENZA, O. V. Diagnóstico Diferencial das Demências. **Rev. Psiq. Clín.**, v. 32, p. 119-130, 2005.
- GUTTERIDGE, J. M. C. The role of superoxide and hydroxyl radicals in phospholipid peroxidation catalysed by iron salts. **FEBS Letters**. v.150, p. 454-458, 1982.
- HABIG, W. H.; PABST, M, J.; JAKOBY, W. J. Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal of biological Chemistry**, 1974.
- HAUPTMANN, S.; KEIL, U.; SCHERPING, I.; BONERT, A.; ECKERT, A.; MULLER, W. E. Mitochondrial dysfunction in sporadic and genetic Alzheimer's disease. **Exp. Gerontol.** v. 41, p. 668-673, 2006.

JÄREMO, P.; MILOVANOVIC, M.; NILSSON, S.; BULLER, C.; POST, C.; WINBLAD, B. Alzheimer's disease is characterized by more low-density erythrocytes with increased volume and enhanced  $\beta$ -amyloid x-40 content. **Journal of Internal Medicine**. v. 270, p. 489–492, 2011.

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**. v. 10, p. 698-712, 2011.

KIVIPELTO, M.; MANGIALASCHE, F.; NGANDU, T. Lifestyle interventions to prevent cognitive impairment, dementia and Alzheimer disease. **Nature Reviews Neurology**. v. 14, p. 653–666, 2018.

KLUGMAN, A.; NAUGHTON, D. P.; ISAAC, M.; SHAH, I.; PETROCZI, A.; TABEL, N. Antioxidant enzymatic activities in alzheimer's disease: The relationship to acetylcholinesterase inhibitors. **Journal of Alzheimer's Disease**. v. 30, n°. 3, p. 467-474, 2012.

KUYUMCU, M. E.; YESIL, Y.; OZTÜRK, Z. A.; KIZILARSLANOĞLU, C.; ETGÜL, S.; HALIL, M.; ULGER, Z.; CANKURTARAN, M.; ARIOĞUL, S. The Evaluation of Neutrophil-Lymphocyte Ratio in Alzheimer's Disease. **Dement Geriatr Cogn Disord**. v. 34, p.69–74, 2012.

LIMA, É. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 37, n. 3, 2001.

MCKHANN, G.M.; KNOPMAN, D.S.; CHERTKOW, H.; HYMAN, B.T.; JACK, C.R.; KAWAS, C.H.; KLUNK, W.E.; KOROSHETZ, W.J.; MANLY, J.J.; MAYEUX, R.; MOHS, R.C.; MORRIS, J.C.; ROSSOR, M.N.; SCHELTENS, P.; CARRILLO, M.C.; THIES, B.; WEINTRAUB, S.; MEGA, M. S. Differential diagnosis of dementia: clinical examination and laboratory assessment. **Clin. Cornerstone**, v. 4, p. 53-65, 2002.

MEGA, M. S. Differential diagnosis of dementia: clinical examination and laboratory assessment. **Clin. Cornerstone**, v. 4, p. 53-65, 2002.

MIETELSKA-POROWSKA, A.; WOJDA, U. T. Lymphocytes and Inflammatory Mediators in the Interplay between Brain and Blood in Alzheimer's Disease: Potential Pools of New Biomarkers. **Journal of Immunology Research**. v. 2017, 2017.

MONTEIRO, V. C. B. Avaliação do estresse oxidativo em humanos e em animais suplementados com ácidos graxos polinsaturados Omega-3. Dissertação. p. 102, 2007.

PULIDO, R.; JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; ORENSANZ, L.; Saura-Calixto, F. Study of plasma antioxidant status in Alzheimer's disease. **European Journal of Neurology**. v. 12, p. 531-535, 2005.

ROJAS-GUTIERREZ, E.; MUÑOZ-ARENAS, G.; TREVIÑO, S.; ESPINOSA, B.; CHAVEZ, R.; ROJAS, K.; FLORES, G.; DÍAZ, A.; GUEVARA, J. Alzheimer's disease and metabolic syndrome: A link from oxidative stress and inflammation to neurodegeneration. **Synapse**. 2017.

SARBAN, S.; KOCYIGIT, A.; YAZAR, M.; ISIKANA, U. Plasma total antioxidant capacity, lipid peroxidation, and erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **Clinical Biochemistry**. v. 38, p. 981-986, 2005.

SCALI, C.; PROSPERI, C.; BRACCO, L.; PICCINI, C.; BARONTI, R.; GINESTRONI, A.; SORBI, S.; PEPEU, G.; CASAMENTI, F. Neutrophils CD11b and fibroblasts PGE2 are elevated in Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**. v. 23, p. 523-530, 2002.

SHAH, R. C.; WILSON, R. S.; TANG, Y.; DONG, X.; MURRAY, A.; BENNETT, D. A. Relation of hemoglobin to level of cognitive function in older persons. **Neuroepidemiology**. v. 32, n° 1, p. 40-46, 2009.

SONG, C.; VANDEWOUDE, M.; STEVENS, W.; DE CLERCK, L.; DER PLANKEN, M.; WHELAN, A.; ANISMAN, H.; DOSSCHE, A.; MAES, M. Alterations in immune functions during normal aging and Alzheimer's disease. **Psychiatry Research**. v. 85, p. 71-80, 1999.

SULTANA, R.; MECOCCHI, P.; MANGIALASCHE, F.; CECCHETTI, R.; BAGLIONI, M.; BUTTERFIELD, DA. Increased protein and lipid oxidative damage in mitochondria isolated from lymphocytes from patients with alzheimer's disease: Insights into the role of oxidative stress in alzheimer's disease and initial investigations into a potential biomarker for this Dementing Disorder. **Journal of Alzheimer's Disease**. v. 24, n° 1, p. 77-84, 2011.

TABET, N.; MANTLE, D.; WALKER, Z.; ORRELL, M. Endogenous antioxidant activities in relation to concurrent vitamins A, C, and E intake in dementia. **International Psychogeriatric Association**. v. 14, p. 7-15, 2002.

VACA, C. E.; WILHELM, J.; HARMS-RINGDAH, M. Interaction of lipid peroxidation products with DNA. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**. v. 195, p. 137-149, 1988.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**. v.30, 2007.

VIÑA, J.; LLORET, A. Why Women Have More Alzheimer's Disease Than Men: Gender and Mitochondrial Toxicity of Amyloid- $\beta$  Peptide. **Journal of Alzheimer's Disease**. vol. 20, n° 2, p. 527-533, 2010.

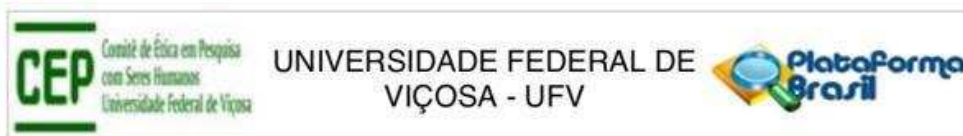
WINCHESTER L. M.; POWELL, J.; LOVESTONE, S.; NEVADO-HOLGADO, A. J. Red blood cell indices and anaemia as causative factors for cognitive function deficits and for Alzheimer's disease. **Genome Medicine**. v. 10, n. 1, p. 1-12, 2018.

## 5 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos podemos concluir que:

- Os pacientes idosos com DA, atendidos no serviço especializado de saúde de Viçosa/MG são predominantemente do sexo feminino.
- Os pacientes com DA apresentaram alterações significativas no perfil celular sanguíneo, com ênfase na redução de linfócitos e aumentos de neutrófilos em relação ao grupo de idosos controle.
- Não apresentaram diferenças estatísticas de FRAP e relação aos idosos sem alteração cognitiva.
- Os pacientes com DA demonstraram reduções significativas nos níveis de CAT em amostras de sangue.
- O marcador MDA resultante da peroxidação lipídica (LPO) apresentou-se significativamente maior no grupo com DA.
- Houve uma correlação inversa entre os níveis de CAT e o marcador MDA, apenas para o grupo de pacientes com DA.

## ANEXO A – Parecer Consubstancial do CEP



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO DO PERFIL INFLAMATÓRIO E OXIDATIVO DE PACIENTES ATENDIDOS EM SERVIÇO DE NEUROPSIQUIATRIA.

**Pesquisador:** Sílvia Almeida Cardoso

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 82870117.0.0000.5153

**Instituição Proponente:** Departamento de Medicina e Enfermagem

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 2.541.609

**Apresentação do Projeto:**

Trata de um projeto da área de conhecimento das Ciências da Saúde

**Objetivo da Pesquisa:**

Segundo formulário online: "Objetivo Primário:

O presente projeto tem como objetivo central determinar o perfil inflamatório e oxidativo associados com distúrbios neuropsiquiátricos.

Objetivo Secundário:

- Categorização dos pacientes atendidos no serviço de referência;- Levantamento de dados socioeconômicos/ambientais e clínicos dos pacientes,

voluntários;- Avaliação metabólica (glicemia, colesterol total, frações e triglicérides); - Avaliação bioquímica (hemograma, ureia, creatinina, AST, ALT,

Vitamina B12 e D);- Avaliação sorológica de marcadores inflamatórios (albumina, PCR e VHS);- Dosagem de enzimas relacionadas com estresse

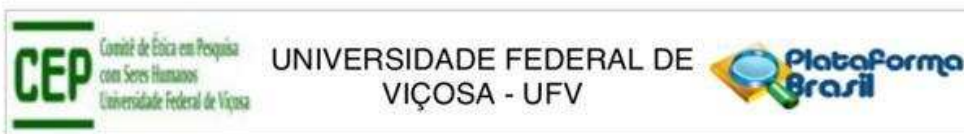
oxidativo;- Dosagem de marcadores de dano celular pelo estresse oxidativo (óxido nítrico, proteína carbonilada e peroxidação lipídica);-

Quantificação de citocinas;- Definição de perfil de proteínas séricas;"

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Segundo formulário online: Riscos:

**Endereço:** Universidade Federal de Viçosa, Avenida PH Rolfs s/n, Edifício Arthur Bernardes  
**Bairro:** Campus Universitário **CEP:** 36.570-900  
**UF:** MG **Município:** VICOSA  
**Telefone:** (31)3899-2492 **E-mail:** cep@ufv.br



Continuação do Parecer: 2.541.609

Constrangimento ao responder o questionário, ou mesmo na consulta médica. Para minimizar o risco, a consulta e o questionário serão realizados

em local adequado e de forma individual, aquele voluntário que se recusar a responder qualquer questionamento, continuará a ser atendido pelo serviço sem qualquer prejuízo.

Na coleta de sangue pode ocorrer desconforto, como leve dor local devido à punção. Assim como extravasamento de sangue de pequeno porte, que desaparece em poucos dias. Para minimizar os riscos, estes procedimentos serão realizados apenas por profissionais devidamente qualificados.

**Benefícios:**

Como benefícios da pesquisa, espera-se obter correlação entre a doença neuropsiquiátricas e o conhecimento do seu padrão inflamatório e do estresse oxidativo, permitindo ao médico que o acompanha usar de ferramentas para possíveis intervenções clínicas e tratamento adequados e visando melhorias na qualidade. O motivo que nos leva a estudar estes fatores é para possibilitar que o Sistema Único de Saúde realize ações que possam ajudar a melhorar o atendimento."

avaliação: riscos e benefícios adequadamente descritos.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Para realização do estudo haverá aplicação de questionários e coleta de sangue.

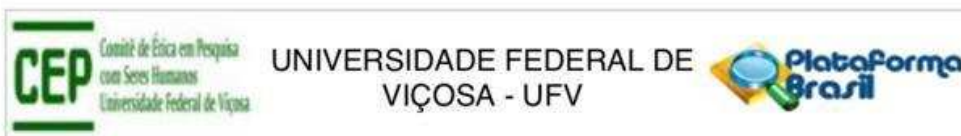
**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Pesquisadores apresentam:

- Formulário online
- Projeto
- Folha de rosto
- Questionários
- Cronograma
- Termo de assentimento
- TCLE

Considerações: Termos adequadamente descritos.

**Endereço:** Universidade Federal de Viçosa, Avenida PH Rolfs s/n, Edifício Arthur Bernardes  
**Bairro:** Campus Universitário **CEP:** 36.570-900  
**UF:** MG **Município:** VICOSA  
**Telefone:** (31)3899-2492 **E-mail:** cep@ufv.br



Continuação do Parecer: 2.541.609

#### Recomendações:

Quando da coleta de dados, o TCLE deve ser elaborado em duas vias, rubricado em todas as suas páginas e assinado, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa ou responsável legal, bem como pelo pesquisador responsável, ou pessoa(s) por ele delegada(s), devendo todas as assinaturas constar na mesma folha.

Não é necessário apresentar os TCLEs assinados ao CEP/UFV. Uma via deve ser mantida em arquivo pelo pesquisador e a outra é do participante da pesquisa.

#### Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado.

#### Considerações Finais a critério do CEP:

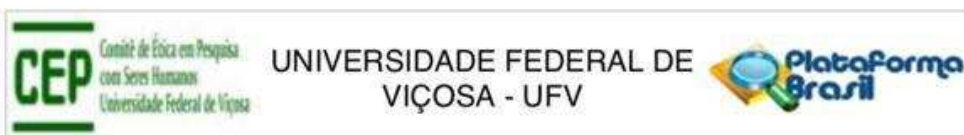
Ao término da pesquisa é necessário apresentar, via notificação, o Relatório Final (modelo disponível no site [www.cep.ufv.br](http://www.cep.ufv.br)). Após ser emitido o Parecer Consubstanciado de aprovação do Relatório Final, deve ser encaminhado, via notificação, o Comunicado de Término dos Estudos para encerramento de todo o protocolo na Plataforma Brasil.

Projeto aprovado autorizando o início da coleta de dados com os seres humanos a partir da data de emissão deste parecer.

#### Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1007743.pdf	30/01/2018 10:34:08		Aceito
Folha de Rosto	folhaderostoprojeto.pdf	30/01/2018 10:33:24	Silvia Almeida Cardoso	Aceito
Outros	questionario5.pdf	25/01/2018 10:02:32	Silvia Almeida Cardoso	Aceito
Outros	questionario4.pdf	25/01/2018 10:01:57	Silvia Almeida Cardoso	Aceito
Outros	questionario3.pdf	25/01/2018 10:01:36	Silvia Almeida Cardoso	Aceito
Outros	questionario2.pdf	25/01/2018 10:01:14	Silvia Almeida Cardoso	Aceito
Outros	questionario1.pdf	25/01/2018 10:00:37	Silvia Almeida Cardoso	Aceito
Cronograma	cronograma.pdf	25/01/2018	Silvia Almeida	Aceito

**Endereço:** Universidade Federal de Viçosa, Avenida PH Rolfs s/n, Edifício Arthur Bernardes  
**Bairro:** Campus Universitário **CEP:** 36.570-900  
**UF:** MG **Município:** VICOSA  
**Telefone:** (31)3899-2492 **E-mail:** cep@ufv.br



Continuação do Parecer: 2.541.609

Cronograma	cronograma.pdf	09:57:56	Cardoso	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termodeacentimeto.pdf	25/01/2018 09:57:40	Silvia Almeida Cardoso	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	25/01/2018 09:57:16	Silvia Almeida Cardoso	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.pdf	25/01/2018 09:56:55	Silvia Almeida Cardoso	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

VICOSA, 13 de Março de 2018

Assinado por:

**Maria da Conceição Aparecida Pereira Zolnier**  
(Coordenador)

**Endereço:** Universidade Federal de Viçosa, Avenida PH Rolfs s/n, Edifício Arthur Bernardes  
**Bairro:** Campus Universitário **CEP:** 36.570-900  
**UF:** MG **Município:** VICOSA  
**Telefone:** (31)3899-2492 **E-mail:** cep@ufv.br

Página



## ANEXO B – Submissão do artigo original

### Manuscript Details

<b>Manuscript number</b>	FRBM_2019_1746
<b>Title</b>	Oxidative profile of patients with Alzheimer's disease under medical care on municipality of Viçosa/MG
<b>Article type</b>	Original article

### Abstract

Alzheimer's disease (AD) has become increasingly incident in the elderly population worldwide, being characterized as a change in the brain parenchyma of its patients. The oxidative stress presents itself as an integral agent in the pathophysiology of AD. To compare the oxidative profile of AD elderly patients with the elderly without cognitive impairment. Research carried out with 38 volunteers under medical care at a Specialized Healthcare Unit, being 24 elderly volunteers with prior AD diagnosis and 18 elderly people without cognitive impairment. The hematological analysis, assessment of markers of oxidative stress, and quantification of oxidative damage markers were performed. There were significant hematological changes that evidenced, in the AD group, reduced levels of lymphocytes and increased neutrophils, resulting in an increased neutrophil-lymphocyte ratio (RN/L) in comparison to the elderly without cognitive impairment, as well as lower hematimetric levels. There was no alteration in detections of FRAP, SOD and GST activities between the two groups evaluated, however the CAT enzyme activity was significantly decreased in the AD group. Only the MDA marker was significantly higher in the AD group, presenting an inverse correlation with CAT dosages for the group in question. Our findings show that AD patients do not present alterations in the serum total antioxidant power, present alterations in antioxidant enzyme pattern as well as in the marker related to lipoperoxidation. Important findings to establish preventive measures for this group of patients.

<b>Keywords</b>	Alzheimer's disease; oxidative stress; neurodegeneration.
<b>Taxonomy</b>	Medical Biochemistry, Biomarker Research
<b>Corresponding Author</b>	Silvia Almeida Cardoso
<b>Corresponding Author's Institution</b>	Universidade Federal de Viçosa
<b>Order of Authors</b>	Mariana Bomfim, Rodrigo Freitas, Daniel Bastos, Paula Ribeiro, Ana Carolina Martins, Bruna Pacheco, Lucas Magalhães, Leandro Licursi de Oliveira, Silvia Almeida Cardoso
<b>Suggested reviewers</b>	Urszula Wojda, Paulo Bertolucci, Nobutaka Hattori, Hye Ryoum Kim

### Submission Files Included in this PDF

#### File Name [File Type]

Cover letter.docx [Cover Letter]

article Alzheimer.docx [Manuscript File]

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.

### Research Data Related to this Submission

There are no linked research data sets for this submission. The following reason is given:  
Data will be made available on request

**ANEXO C – Termo de Assentimento Livre e Esclarecido**

Você \_\_\_\_\_ está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa “Perfil Oxidativo de Pacientes com Doença de Alzheimer”, sendo que seu representante legal, Sr (a) \_\_\_\_\_ autorizou sua participação. Nesta pesquisa pretendemos determinar o perfil oxidativo de pacientes com Doença de Alzheimer. Para esta pesquisa adotaremos os seguintes procedimentos: Aplicação de um questionário para doença neuropsiquiátrica e coleta de sague para análises laboratoriais. O questionário será realizado no Centro Estadual de Atenção Especializada em Viçosa. O tempo de aplicação do questionário é de aproximadamente 15 minutos. A coleta do material biológico (sangue) será feita por profissionais treinados para esses procedimentos e para orientação de possíveis complicações. Todos os exames serão realizados no Centro Estadual de Atenção Especializada em Viçosa em dia e horário previamente estabelecido, em local adequado que preserva a sua intimidade e tranquilidade. O referido serviço tem disponível todo material necessário para o atendimento de eventuais urgências. Será coletado apenas uma amostra de sangue. Como benefícios da pesquisa, espera-se obter correlação entre a doença neuropsiquiátricas e o conhecimento do seu padrão inflamatório e do estresse oxidativo, permitindo ao médico que o acompanha usar de ferramentas para possíveis intervenções clínicas e tratamento adequados e visando melhorias na qualidade. O motivo que nos leva a estudar estes fatores é para possibilitar que o Sistema Único de Saúde realize ações que possam ajudar a melhorar o atendimento. Um dos riscos envolvidos na pesquisa consiste em constrangimento durante a consulta médica e ao responder o questionário, e para minimizar tal constrangimento o questionário será aplicado em local adequado e individualmente e você poderá se recusar a responder uma ou mais perguntas, sem que isso implique em qualquer alteração na forma como você será atendido (a) na unidade. No exame de sangue é possível que ocorram os seguintes desconfortos ou riscos: no momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor decorrente da punção da pele; complicações de coleta de sangue rotineira são raras e geralmente de pequeno porte; se houver pequena perda de sangue da veia no local da punção geralmente há um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias, mas os profissionais estão aptos a resolver o problema e prestar as devidas orientações. Os exames complementares utilizados para a pesquisa serão realizados em laboratórios vinculados a Universidade Federal de Viçosa e a amostra biológica (sangue) será descartada após análise. Você continuará recebendo o acompanhamento no ambulatório mesmo após o encerramento e

/ou interrupção da pesquisa. Não haverá nenhum custo para você participar deste estudo e nem você receberá qualquer vantagem financeira. Apesar disso, diante de eventuais danos, identificados e comprovados, decorrentes da pesquisa, você tem assegurado o direito à indenização. Você tem garantida plena liberdade de recusar-se a participar ou o retirar seu consentimento e interromper a sua participação, em qualquer fase da pesquisa, sem necessidade de comunicado prévio. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido (a) pelo pesquisador. Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Você não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar. O seu nome ou o material que indique a sua participação não serão liberados sem a sua permissão. Este termo de assentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, no “Centro Estadual de Atenção Especializada em Viçosa” e a outra será fornecida a você. Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 (cinco) anos após o término da pesquisa, e depois desse tempo serão destruídos. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo e confidencialidade, atendendo à legislação brasileira, em especial, à Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, e utilizarão as informações somente para fins acadêmicos e científicos. Nesta pesquisa não será necessário a utilização de recursos como filmagens, fotos ou gravações.

#### AUTORIZAÇÃO PARA PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

Eu, \_\_\_\_\_ e meu responsável legal \_\_\_\_\_, fomos informados (as) dos objetivos da pesquisa “Avaliação do perfil inflamatório e oxidativo de pacientes atendidos em serviço de neuropsiquiatria” de maneira clara e detalhada, esclarecemos nossas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim o desejar. Recebi uma via original deste termo de assentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer minhas dúvidas, bem como ao meu responsável legal.

---

Nome do participante

---

Nome do Pesquisador Responsável:

Endereço: Departamento de Medicina e Enfermagem Av. PH Rolfs, s/n – Campus  
Universitário Cep: 36570-900 Viçosa/MG Telefone: (31) 3899-3991 Email:  
[cardososil@yahoo.com.br](mailto:cardososil@yahoo.com.br)

Em caso de discordância ou irregularidades sob o aspecto ético desta pesquisa, você poderá  
consultar: CEP/UFV – Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos Universidade  
Federal de Viçosa Edifício Arthur Bernardes, piso inferior Av. PH Rolfs, s/n – Campus  
Universitário Cep: 36570- 900 Viçosa/MG Telefone: (31)3899-2492 Email: [cep@ufv.br](mailto:cep@ufv.br)  
[www.cep.ufv.br](http://www.cep.ufv.br)

Viçosa - MG, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_\_.

**ANEXO D – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Você \_\_\_\_\_ está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa “Perfil Oxidativo de Pacientes com Doença de Alzheimer”, sendo que seu representante legal, Sr (a) \_\_\_\_\_ autorizou sua participação. Nesta pesquisa pretendemos determinar o perfil oxidativo de pacientes com Doença de Alzheimer. Para esta pesquisa adotaremos os seguintes procedimentos: Aplicação de um questionário para doença neuropsiquiátrica e coleta de sague para análises laboratoriais. O questionário será realizado no Centro Estadual de Atenção Especializada em Viçosa. O tempo de aplicação do questionário é de aproximadamente 15 minutos. A coleta do material biológico (sangue) será feita por profissionais treinados para esses procedimentos e para orientação de possíveis complicações. Todos os exames serão realizados no Centro Estadual de Atenção Especializada em Viçosa em dia e horário previamente estabelecido, em local adequado que preserva a sua intimidade e tranquilidade. O referido serviço tem disponível todo material necessário para o atendimento de eventuais urgências. Será coletado apenas uma amostra de sangue. Como benefícios da pesquisa, espera-se obter correlação entre a doença neuropsiquiátricas e o conhecimento do seu padrão inflamatório e do estresse oxidativo, permitindo ao médico que o acompanha usar de ferramentas para possíveis intervenções clínicas e tratamento adequados e visando melhorias na qualidade. O motivo que nos leva a estudar estes fatores é para possibilitar que o Sistema Único de Saúde realize ações que possam ajudar a melhorar o atendimento. Um dos riscos envolvidos na pesquisa consiste em constrangimento durante a consulta médica e ao responder o questionário, e para minimizar tal constrangimento o questionário será aplicado em local adequado e individualmente e você poderá se recusar a responder uma ou mais perguntas, sem que isso implique em qualquer alteração na forma como você será atendido (a) na unidade. No exame de sangue é possível que ocorram os seguintes desconfortos ou riscos: no momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor decorrente da punção da pele; complicações de coleta de sangue rotineira são raras e geralmente de pequeno porte; se houver pequena perda de sangue da veia no local da punção geralmente há um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias, mas os profissionais estão aptos a resolver o problema e prestar as devidas orientações. Os exames complementares utilizados para a pesquisa serão realizados em laboratórios vinculados a Universidade Federal de Viçosa e a amostra biológica (sangue) será descartada após análise. Você continuará recebendo o acompanhamento no ambulatório mesmo após o encerramento e

/ou interrupção da pesquisa. Não haverá nenhum custo para você participar deste estudo e nem você receberá qualquer vantagem financeira. Apesar disso, diante de eventuais danos, identificados e comprovados, decorrentes da pesquisa, você tem assegurado o direito à indenização. Você tem garantida plena liberdade de recusar-se a participar ou o retirar seu consentimento e interromper a sua participação, em qualquer fase da pesquisa, sem necessidade de comunicado prévio. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido (a) pelo pesquisador. Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Você não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar. O seu nome ou o material que indique a sua participação não serão liberados sem a sua permissão. Este termo de assentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, no “Centro Estadual de Atenção Especializada em Viçosa” e a outra será fornecida a você. Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 (cinco) anos após o término da pesquisa, e depois desse tempo serão destruídos. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo e confidencialidade, atendendo à legislação brasileira, em especial, à Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, e utilizarão as informações somente para fins acadêmicos e científicos. Nesta pesquisa não será necessário a utilização de recursos como filmagens, fotos ou gravações.

#### AUTORIZAÇÃO PARA PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

Eu , \_\_\_\_\_ e meu responsável legal \_\_\_\_\_, fomos informados(as) dos objetivos da pesquisa “Avaliação do perfil inflamatório e oxidativo de pacientes atendidos em serviço de neuropsiquiatria” de maneira clara e detalhada, esclarecemos nossas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim o desejar. Recebi uma via original deste termo de assentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer minhas dúvidas, bem como ao meu responsável legal.

---

Nome do participante

---

Nome do Pesquisador Responsável:

Endereço: Departamento de Medicina e Enfermagem Av. PH Rolfs, s/n – Campus  
Universitário Cep: 36570-900 Viçosa/MG Telefone: (31) 3899-3991

Email: [cardososil@yahoo.com.br](mailto:cardososil@yahoo.com.br)

Em caso de discordância ou irregularidades sob o aspecto ético desta pesquisa, você poderá  
consultar: CEP/UFV – Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos Universidade  
Federal de Viçosa Edifício Arthur Bernardes, piso inferior Av. PH Rolfs, s/n – Campus  
Universitário Cep: 36570- 900 Viçosa/MG Telefone: (31)3899-2492 Email: cep@ufv.br  
www.cep.ufv.br

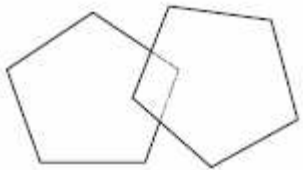
Viçosa - MG, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20 \_\_\_\_.

**ANEXO E – Mini Exame do Estado Mental**

Data:

Analfabeto ( ) Sim ( ) Não

<b>AVALIAÇÃO</b>	<b>NOTA</b>	<b>VALOR</b>
<b>ORIENTAÇÃO TEMPORAL</b>		
. Que dia é hoje?		1
. Em que mês estamos?		1
. Em que ano estamos?		1
. Em que dia da semana estamos?		1
. Qual a hora aproximada? (considere a variação de mais ou menos uma hora)		1
<b>ORIENTAÇÃO ESPACIAL</b>		
. Em que local nós estamos? (consultório, enfermaria, andar)		1
. Qual é o nome deste lugar? (hospital)		1
. Em que cidade estamos?		1
. Em que estado estamos?		1
. Em que país estamos?		1
<b>MEMÓRIA IMEDIATA</b>		
Eu vou dizer três palavras e você irá repeti-las a seguir, preste atenção, pois depois você terá que repeti-las novamente. (dê 1 ponto para cada palavra) Use palavras não relacionadas.		3
<b>ATENÇÃO E CÁLCULO</b>		
5 séries de subtrações de 7 (100-7, 93-7, 86-7, 79-7, 72-7, 65). (Considere 1 ponto para cada resultado correto. Se houver erro, corrija-o e prossiga. Considere correto se o examinado espontaneamente se autocorriger). Ou: Soletrar a palavra mundo ao contrário		5
<b>EVOCAÇÃO</b>		
Pergunte quais as três palavras que o sujeito acabara de repetir (1 ponto para cada palavra)		3
<b>NOMEAÇÃO</b>		
Peça para o sujeito nomear dois objetos mostrados (1 ponto para		2

cada objeto)		
<b>REPETIÇÃO</b>		
Preste atenção: vou lhe dizer uma frase e quero que você repita depois de mim: Nem aqui, nem ali, nem lá. (considere somente se a repetição for perfeita)		1
<b>COMANDO</b>		
Pegue este papel com a mão direita (1 ponto), dobre-o ao meio (1 ponto) e coloque-o no chão (1 ponto). (Se o sujeito pedir ajuda no meio da tarefa não dê dicas)		3
<b>LEITURA</b>		
Mostre a frase escrita: FECHÉ OS OLHOS. E peça para o indivíduo fazer o que está sendo mandado. (Não auxilie se pedir ajuda ou se só ler a frase sem realizar o comando)		1
<b>FRASE ESCRITA</b>		
Peça ao indivíduo para escrever uma frase. (Se não compreender o significado, ajude com: alguma frase que tenha começo, meio e fim; alguma coisa que aconteceu hoje; alguma coisa que queira dizer. Para a correção não são considerados erros gramaticais ou ortográficos)		1
<b>CÓPIA DO DESENHO</b>		
Mostre o modelo e peça para fazer o melhor possível. Considere apenas se houver 2 pentágonos interseccionados (10 ângulos) formando uma figura de quatro lados ou com dois ângulos.		1
		
<b>TOTAL</b>		

Considerar apto para ingressar no programa pacientes com pontuação igual ou acima de 19, para analfabetos e pontuação igual ou acima de 24 para pessoas com escolaridade.