

UNIVERSIDADE VILA VELHA – ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ESTRESSE OXIDATIVO E COGNIÇÃO EM PACIENTES COM DOENÇA DE
ALZHEIMER: EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO SIMBIÓTICA**

ALYNE MENDONÇA MARQUES TON

VILA VELHA – ES

MARÇO/2020

UNIVERSIDADE VILA VELHA – ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ESTRESSE OXIDATIVO E COGNIÇÃO EM PACIENTES COM DOENÇA DE
ALZHEIMER: EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO SIMBIÓTICA**

Tese apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para a obtenção do grau de doutora em Ciências Farmacêuticas

ALYNE MENDONÇA MARQUES TON

VILA VELHA – ES

MARÇO/2020

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

T663e Ton, Alyne Mendonça Marques.

Estresse oxidativo e cognição em pacientes com doença de Alzheimer: efeitos da suplementação simbiótica / Alyne Mendonça Marques Ton. – 2020.

66 f.: il.

Orientador: Elisardo Corral Vasquez.

Tese (doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Vila Velha, 2020.

Inclui bibliografias.

1. Probióticos. 2. Alzheimer, Doença de – Pacientes – Cuidado e tratamento. 3. Cognição. I. Vasquez, Elisardo Corral. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 615

ALYNE MENDONÇA MARQUES TON

ESTRESSE OXIDATIVO E COGNIÇÃO EM PACIENTES COM DOENÇA DE
ALZHEIMER: EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO SIMBIÓTICA

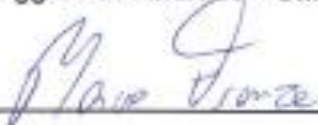
Tese apresentada à Universidade Vila
Velha, como pré-requisito do Programa
de Pós-graduação em Ciências
Farmacêuticas, para a obtenção do
grau de doutora em Ciências
Farmacêuticas

Aprovada em 02 de março de 2020.

Banca examinadora:


Prof. Dr. Thiago de Melo Costa Pereira – Universidade Vila Velha


Prof. Dr. Taddeu Uggere de Andrade – Universidade Vila Velha


Prof. Dr. Marcio Fronza – Universidade Vila Velha


Prof. Dr. Manuel Campos-Toimil – Universidade de Santiago de Compostela


Prof. Dr. Elisardo Corral Vasquez (Orientador) – Universidade Vila Velha

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sua grandiosidade e sua onipresença a cada passo meu.

Aos meus pais, Soraya e Gualter, pela compreensão, pelo cuidado, pela parceria e por não permitirem, jamais, que os meus sonhos terminem antes de poderem germinar.

Ao meu irmão, Felipe, por ser minha maior inspiração de vida e por me fazer compreender o que é a verdadeira incondicionalidade do amor fraternal.

Ao Valentim, por jamais me deixar sentir só durante toda a caminhada.

Ao meu companheiro de vida, Angelo Ton, por embarcar nas minhas loucuras e por ser a paz que eu preciso, a calma que me equilibra e o estopim de força que me faz acordar e persistir a cada dia.

Ao meu orientador e amigo, professor Dr. Elisardo Corral Vasquez, por ter me aceitado em sua rotina de forma tão entusiástica. Por ter me permitido fazer parte da sua vida durante esses 4 anos e, então, compreender, a grandiosidade presente na humildade dos gênios. Foi uma honra e um prazer poder aprender com o senhor.

Ao professor Dr. Thiago de Melo, à professora Dr.^a Bianca Campagnaro e à incrível microbiologista e mestre Clarisse Máximo, pela paciência, pelo apoio, contribuição e disponibilidade. Sem vocês, eu não teria conseguido!

Ao Dr. Manoel Campos pelas ideias compartilhadas e pelo incentivo.

À UVV, todos os funcionários e demais professores que, de alguma forma, contribuíram com a minha formação.

Agradeço, especialmente, às agências de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) e a Agência Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) do Ministério de Ciência e Tecnologia pelo financiamento deste projeto, por meio do Edital FAPES/CNPq - 24/2018 - PRONEx - #84321148, Termo de Outorga 569/2018.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	I
LISTA DE TABELAS.....	IV
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	V
RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
1. INTRODUÇÃO.....	9
1.1. BREVE HISTÓRICO.....	9
1.2. ESTADO DA ARTE ATUAL.....	10
1.3. O PAPEL DO ESTRESSE OXIDATIVO COMO UM FATOR MARCANTE NA DOENÇA DE ALZHEIMER.....	12
1.4. MARCADORES DE INFLAMAÇÃO DA DOENÇA DE ALZHEIMER.....	15
1.5. A INTERAÇÃO MORFOFUNCIONAL ENTRE A MICROBIOTA E A FUNÇÃO INTEGRATIVA DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL.....	16
1.6. IMPACTO DO DÉFICIT COGNITIVO NO DIA-A-DIA DO PACIENTE COM DOENÇA DE ALZHEIMER.....	18
1.7. DESAFIOS NO TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER.....	19
1.8. JUSTIFICATIVA DA PESQUISA.....	22
2. OBJETIVOS.....	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1 CASUÍSTICA.....	24
3.2 PREPARAÇÃO DO LEITE FERMENTADO COM KEFIR.....	25
3.3. AVALIAÇÃO COGNITIVA.....	25
3.4. DOSAGEM DE CITOCINAS.....	31
3.5. QUANTIFICAÇÃO DE ROS.....	31

3.6.AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE CELULAR.....	32
3.7. AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA.....	32
4. RESULTADOS.....	34
4.1 CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES.....	34
4.2.AVALIAÇÃO COGNITIVA.....	34
4.3. AVALIAÇÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS.....	35
4.4. BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO.....	37
4.5. ENSAIO DE APOPTOSE.....	38
5. DISCUSSÃO.....	39
6. CONCLUSÃO.....	44
7. REFERÊNCIAS.....	46
8. ANEXOS.....	63
8.1 ANEXO A: PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP.....	63
8.2 ANEXO B: ESCALA DE DEPRESSÃO DE HAMILTON.....	64

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** **Figura 1: (A) Imagem demonstrando esquematização do aspecto à microscopia dos emaranhados neurofibrilares criada por Alois Alzheimer em 2001; (B) Aspecto, à microscopia eletrônica conforme demonstrado por Bondi et al. (2017).**
- Figura 2.** **Figura 2: Imagem ilustrativa demonstrando a expectativa de Aumento proporcional da incidência de DA por divisão continental. (Adaptado de Ziegler-Graham et al., 2007).**
- Figura 3.** **Gráfico demonstrando as mudanças no índice de mortalidade por causa específica relatados nos últimos 10 anos. (Adaptado de Alzheimer's Disease Facts and Figures, 2019).**
- Figura 4.** **Interação entre a microbiota intestinal e os sistemas neuroendócrino e neuroimunes. A microbiota intestinal exerce efeito (i) de barreira por meio das *tight junctions* e dos enterócitos; (ii) imunomodulatório e anti-inflamatório, por meio do recrutamento do sistema imune e (iii) de produção de energia, via metabolismo dos ácidos graxos de cadeia curta, vitaminas e hormônios. (Vasquez et al, 2019)**
- Figura 5:** **Esquema descritivo demonstrando os estudos clínicos atualmente em andamento desenvolvidos com o objetivo de testar novas drogas no tratamento da DA. (Cummings et al., 2019)**
- Figura 6.** **Esquema demonstrando os principais mecanismos em evidência relacionados à deterioração cognitiva e neuropatológica e à inflamação em pacientes com síndrome demencial.**

- Figura 7. Etapas envolvidas na seleção da amostra final.**
- Figura 8. Registro de análises inclusas no Mini Exame do Estado Mental (MEEM), identificando as habilidades pesquisadas durante a bateria cognitiva e o critério de pontuação. (Adaptado de Nitrini et al., 2005.)**
- Figura 9. Quadro de recordação utilizado durante a bateria cognitiva.**
O indivíduo é convidado a memorizar todos os objetos durante 120 segundos apresentados e evocar o maior número possível em um primeiro (memória imediata) e um segundo momento (memória tardia). (Adaptado de Nitrini et al., 2005.)
- Figura 10. Imagem utilizada na avaliação das habilidades visuo-espaciais.** Apresenta-se a cena ao indivíduo, que é solicitado a descrever minuciosamente o que é observado, pontuando-se o número de acertos. (Adaptado de Nitrini et al., 2005.)
- Figura 11. Prancha de pontuação do Teste de Nomenclatura de Boston.**
O indivíduo é apresentado às imagens dos itens supradescritos em uma tela digital, devendo descrever o nome dos objetos ou sua função em até 10 segundos. (Adaptado de Nitrini et al., 2005.)
- Figura 12. Imagem utilizada na aplicação do Teste de Trilhas A.** Durante esta análise, o indivíduo deve desenhar uma linha conectando os números na ordem crescente. Pontua-se os acertos em 120 segundos. (Adaptado de Nitrini et al., 2005.)
- Figura 13. Ilustração demonstrando a classificação dos possíveis resultados obtidos na aplicação do teste do desenho do relógio.** Pede-se ao indivíduo que desenhe um relógio analógico, cujos ponteiros estão marcando 14:45hs. (Adaptado de Nitrini et al., 2005.)
- Figura 14. Série de painéis demonstrando os resultados da bateria cognitiva antes e após o tratamento utilizando kefir. (a) Estado cognitivo global (por meio da aplicação do MEEM, comparando o efeito do tratamento com os valores previamente observados. (b) Análise de memória (imediate e tardia, à esquerda), habilidades**

visuo-espaciais e de abstração (por meio da aplicação do Teste de Similaridades e da Prancha do Roubo de Biscoitos, ao centro) e das funções executivas e de linguagem (por meio da aplicação do Teste de Nomenclatura de Boston e da Fluência Verbal, à direita). (c) Habilidades construtivas e de atenção, com a demonstração dos desenhos típicos apresentados pelos pacientes durante a análise. Os resultados foram expressados em média $\pm$ SEM (n = 13). *p < 0.05 em comparação à T0.

Figura 15. **Níveis de citocinas medidos por Cytometric Bead Array (CBA) utilizando o protocolo realizado por análise de citometria de fluxo.** Os valores de concentração de TNF- α (a), IL-1b (b), IL-6 (c), IL-8 (d), IL-12p70 (e), IL-10 (f) e o índice da razão entre os marcadores pró inflamatórios e os marcadores anti-inflamatórios (g) foram medidos antes e após a suplementação simbiótica. Os resultados foram expressados em $\pm$ SEM (n = 13). *p < 0.05 em comparação à T0.

Figura 16. **Níveis de ânion superóxido, peroxide de hidrogênio, peroxinitrito/radical hidroxila e óxido nítrico (DHE, DCF, HPF e DAF, respectivamente).** Os valores da produção de ROS foram definidos antes e após 90 dias da suplementação simbiótica. Nota-se uma marcada recuperação do balanço de ROS após o tratamento. Os resultados foram expressados em média $\pm$ SEM (n = 13). *p < 0.05 em comparação a T0.

Figura 17. **Marcada redução no índice de apoptose celular, demonstrada pelo teste da Anexina V.** O resultado foi expresso em média $\pm$ SEM (n = 13). *p = 0.0002 em comparação à T0.

Figura 18. **Esquema simplificado demonstrando os principais efeitos após 90 dias de suplementação com kefir em pacientes com doença de Alzheimer.**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. **Características demográficas dos pacientes.**

Tabela 2. **Exemplos de produtos não farmacológicos que foram estudados em pacientes com doença de Alzheimer e patologias correlacionadas.**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A β Os	Oligômeros solúveis do peptídeo β -amilóide
BNDF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BHE	Barreira hematoencefálica
CBA	Cytometric Bead Array
DA	Doença de Alzheimer
DAF	Diaminofluoresceína
DCF	Diclorofluoresceína
DHE	Di-hidroetidina
HPF	Hidroxifenil fluoresceína
FDA	Food and Drug Administration
GPx	Glutathione peroxidase
IL-1b	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL12p70	Interleucina 12p70
MEEM	Mini-Exame do Estado Mental
MFI	Intensidade de fluorescência média
NFjB	Fator jB nuclear
NMDA	N-metil D-Aspartato
NO	Óxido nítrico
ONOO ⁻	Peroxinitrito

PI	Iodeto de propídio
PS	Fosfatidilserina
PRB	Prancha do Roubo de Biscoitos
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SRRA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TREM2	Triggering receptor expressed in microglial/myeloid cells2
$\bullet\text{O}_2^-$	Ânion superóxido
$\bullet\text{OH}^-$	Radical hidroxila

RESUMO

TON, ALYNE MENDONÇA MARQUES, M. Sc, Universidade Vila Velha – ES, março de 2020. **Estresse oxidativo e cognição em pacientes com doença de Alzheimer: efeitos da suplementação simbiótica.** Orientador: Elisardo Corral Vasquez.

A doença de Alzheimer (DA) é a causa mais comum de demência em pacientes idosos. Recentemente, vários estudos demonstraram que o estado hiperinflamatório e o estresse oxidativo precedem as manifestações neuropatológicas cardinais da DA. Tendo em vista os comprovados efeitos antioxidantes dos simbióticos, propusemos que a suplementação alimentar contínua com leite fermentado com grãos de kefir poderia melhorar os distúrbios o status cognitivo neste grupo de pacientes. Este estudo foi desenvolvido como uma investigação clínica não controlada para testar os efeitos da suplementação com leite fermentado com simbióticos (2mL/kg/ dia) durante 90 dias. Os sujeitos avaliados foram submetidos à bateria cognitiva e a coleta de material biológico para quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e dosagem de biomarcadores antes (T0) e após (T90) a suplementação. Observou-se, após a intervenção, uma melhora cognitiva acentuada nos domínios memória, capacidade visual-espacial e abstração, funções executivas e linguagem. A análise citométrica evidenciou uma redução significativa na dosagem das citocinas pró inflamatórias e nos marcadores de inflamação e estresse oxidativo ($\bullet\text{O}_2^-$, H_2O_2 e ONOO^- , ~ 30%) acompanhados por aumento da biodisponibilidade de NO (100%) e aumento da viabilidade celular. Conclui-se, portanto, que a suplementação com kefir apresenta efeitos modulatórios neste grupo de pacientes, sendo capaz de atenuar os danos cognitivos relacionados à base neuropatológica da DA, reduzindo a inflamação sistêmica e o estresse oxidativo, revelando-se como uma terapia adjuvante promissora contra a progressão da DA.

Palavras-chave: probiótico, simbiótico, microbioma, doença de Alzheimer, inflamação, cognição, citocinas

ABSTRACT

TON, ALYNE MENDONÇA MARQUES, M. Sc, University of Vila Velha – ES, March, 2020. **Oxidative stress and cognition in Alzheimer's subjects: effects of synbiotic supplementation.** Advisor: Elisardo Corral Vasquez.

Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia in elderly patients. Recently, several studies have shown that inflammation and oxidative stress precedes the cardinal neuropathological manifestations of AD. In view of the proven antioxidant effects of synbiotics, we tested the hypothesis that continuous dietary supplementation with milk fermented with kefir grains might improve cognitive and metabolic and/or cellular disorders in the AD patients. This study was designed as an uncontrolled clinical investigation to test the effects of synbiotic-fermented milk supplementation (2 mL/kg/daily) for 90 days in AD patients exhibiting cognitive deficit. Cognitive assessment, cytokines expression, systemic oxidative stress levels and blood cell damage biomarkers were evaluated before (T0) and after (T90) kefir synbiotic supplementation. When the patients were challenged to solve 8 classical tests, the majority exhibit a marked improvement in memory, visual-spatial/abstraction abilities and executive/language functions. At the end of the treatment, the cytometric analysis showed an absolute/relative decrease in several cytokine markers of inflammation and oxidative stress markers ($\bullet\text{O}_2^-$, H_2O_2 and ONOO^- , ~30%) accompanied by increase of NO bioavailability (100%). In conclusion, we demonstrated that kefir improves cognitive deficits, which seems to be linked to systemic inflammation and oxidative stress reduction, revealing itself as a promising adjuvant therapy against AD progression.

Key-words: probiotic, synbiotic, microbiome, Alzheimer's disease, inflammation, cognition, cytokines

1. INTRODUÇÃO

1.1. Breve histórico

A síndrome clínica demencial com associação neuropatológica degenerativa foi citada, pioneiramente, por Aloysius “Alöis” Alzheimer em 1907, ao descrever os sintomas de uma mulher de 51 anos, Auguste Deter, que encontrava-se sob seus cuidados em Frankfurt, na Alemanha (Stelzmann et al., 1995). A descrição de Alzheimer sobre os sintomas da paciente foi, quase certamente, a primeira caracterização neuropsicológica da doença:

“A memória dela está seriamente comprometida. Se lhe forem mostrados objetos, ela nos nomeia corretamente mas, quase imediatamente depois, esqueceu tudo. Ao ler um teste, ela pula de uma linha para outra ou lê soletrando as palavras individualmente ou tornando-as sem sentido por meio de sua pronúncia. Por escrito, repete muitas sílabas separadas, omite outras e, rapidamente, se decompõe completamente. Ao falar, ela usa preenchimentos de lacunas e algumas expressões parafraseadas (“vazador de leite” em substituição de “xícara”). Às vezes, é óbvio que ela não consegue continuar. Claramente, ela não entende certas perguntas e não se lembra do uso de alguns objetos.”

Quando Auguste Deter morreu, Alzheimer utilizou-se de técnicas de coloração histológica em prata e outros elementos para analisar o tecido cerebral, as quais haviam sido desenvolvidas, no ano anterior, por Ramon e Cajal – primeiro a identificar os neurônios como unidades do sistema nervoso - e Camillo Golgi, laureados, por este motivo, com o prêmio Nobel de medicina ou fisiologia em 1906. Essa inovação metodológica de impregnação de amostras teciduais, contribuiu para a identificação de emaranhados neurofibrilares e placas neuríticas que se tornariam os marcadores cardinais neuropatológicos desta síndrome (Bondi et al, 2018).

A partir de então, os pacientes com distúrbio neuronal caracterizado por demência, quando em associação à presença de tais achados histopatológicos, passaram a ser denominados como portadores de doença de Alzheimer (DA). (Mauer & Mauer, 2003).

O Manual de Diagnóstico Estatístico das Desordens Mentais (DSM), em sua segunda versão publicada em 1968, definiu a doença de Alzheimer como uma condição mental resultante do comprometimento difuso da função cerebral por qualquer causa, afetando as funções maiores de orientação, atenção, memória, intelecto, julgamento e afeto, em associação à presença dos cardinais neuropatológicos descritos (APA, 1968). Essa complexidade de fatores constitui

aquilo que hoje é definido como síndrome clínica demencial, revelando uma abrangência conceitual extremamente mais vasta do que se imaginava naquela época.

Embora a demência esteja associada a mais de 70 diferentes fatores etiológicos, a DA mantém-se, desde sua definição, como a causa mais prevalente, sendo responsável por, aproximadamente, metade de todos os casos (Cummings & Benson, 1992). Todavia, o desenvolvimento de conceitos que envolvem os mecanismos de prevenção, tratamento e, possivelmente, ferramentas de reversão dos danos cognitivos utilizando-se de farmacoterapia foram desenvolvidos apenas após décadas de suas primeiras descrições, coincidindo com a evolução de pensamento no que tange à descoberta de novos biomarcadores de fase precoce e a necessidade de ampliar esforços focados em medidas de intervenção clínica, em consonância com o projeto que engloba a presente tese (Bondi et al, 2018)

1.2 Estado da arte atual

A doença de Alzheimer é a causa mais comum de demência em pacientes idosos, apresentando características de neurodegeneração disseminada e dois principais marcadores etiopatogênicos: as placas neuríticas e os emaranhados neurofibrilares (Liu et al., 2015; Yiannopoulou & Papageorgiou, 2020). As placas neuríticas consistem, predominantemente, em depósitos extracelulares de peptídeos β -amilóides, enquanto os emaranhados neurofibrilares são formados pela agregação da proteína tau hiperfosforilada (Liu et al., 2015; Bondi et al., 2017; Assal, 2019; Barnett, 2019; e Knopman et al, 2019).(Figura 1)

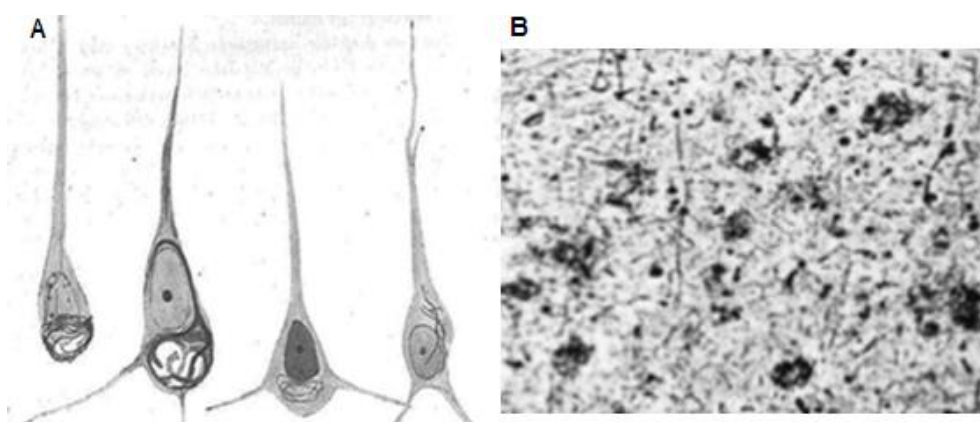


Figura 1: (A) Imagem demonstrando esquematização do aspecto à microscopia dos emaranhados neurofibrilares criada por Alois Alzheimer em 1911; (B) Aspecto, à microscopia eletrônica conforme demonstrado por Bondi et al. (2017).

A demência na DA é definida, em termos clínicos, como um declínio progressivo, global e irreversível das funções cognitivas que, invariavelmente, cursa com profundo impacto socio-emocional e altos índices de dependência funcional (Beck et al., 1982; Duong et al., 2017; Brayne & Miller, 2017; Bastin et al., 2019). A prevalência global da DA tem apresentado um crescimento progressivo nas últimas décadas, com um aumento proporcional global de 117% nos últimos 26 anos, sendo os maiores índices de prevalência locais referidos na Turquia e no Brasil (GDB Dementia Collaborators, 2019). (Figura 2)

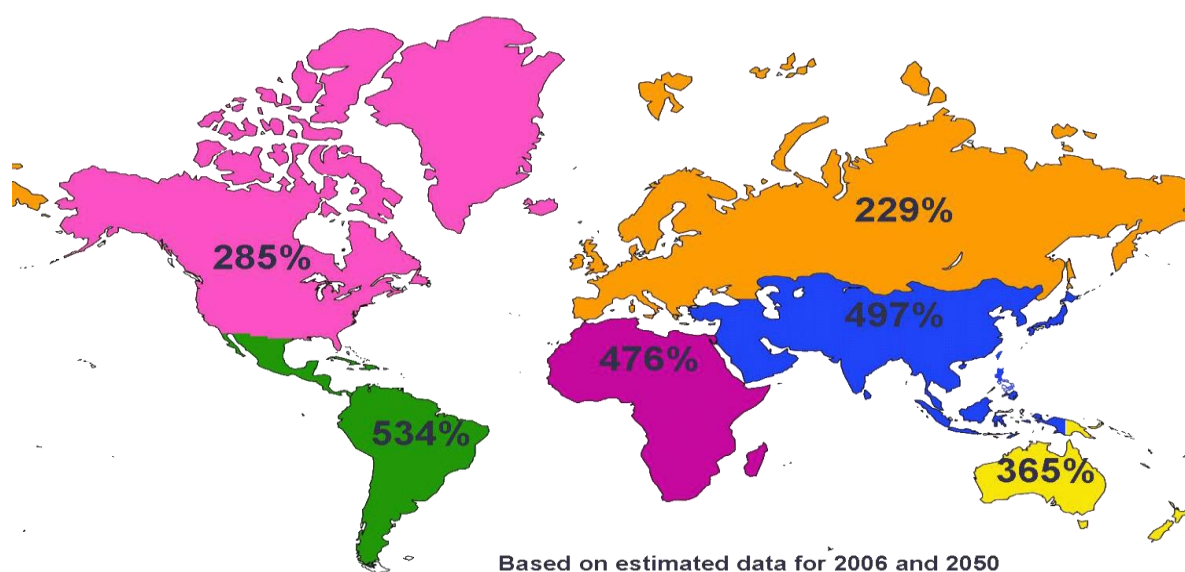


Figura 2: Imagem ilustrativa demonstrando a expectativa de aumento proporcional da incidência de DA por divisão continental (Adaptado de Ziegler-Graham et al., 2007)

Neste cenário, nota-se, de maneira interessante, a mudança nos índices de mortalidade por causa específica relatados nos últimos 10 anos, demonstrando uma clara redução nas mortes secundárias às doenças cardíacas (8,9%), cerebrovasculares (12,7%), câncer de próstata (1,9%) e imunodeficiência humana adquirida (60,6%) com um aumento de 145% na prevalência de mortes em consequência do diagnóstico de DA neste mesmo período (Alzheimer's Association, 2019; Vasquez et al., 2020, *in press*). A análise desta mudança coloca a DA em uma situação central no que tange à necessidade de modificação e desenvolvimento de políticas públicas que suportem a dramaticidade do impacto socioeconômico deste diagnóstico, diretamente relacionado com o aumento da sobrevivência individual global e a associação à fatores de risco cardiovasculares (Figura 3).

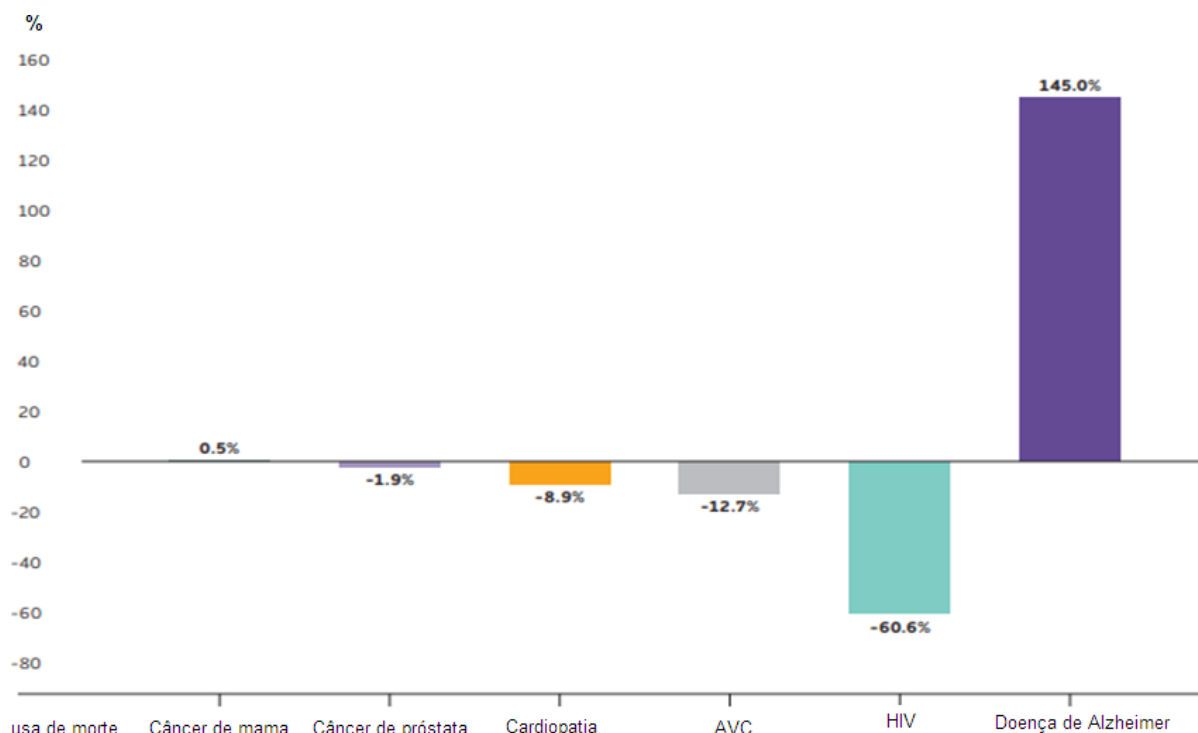


Figura 3: Gráfico demonstrando as mudanças no índice de mortalidade por causa específica relatados nos últimos 10 anos. (Adaptado de Alzheimer's Disease Facts and Figures, 2019).

1.3. O papel do estresse oxidativo como fator marcante na doença de Alzheimer

A DA é, caracteristicamente, uma doença degenerativa multifatorial e poligênica o que, em última instância, dificulta o rastreo dos mecanismos por meio dos quais há o desenvolvimento exato dos danos celulares e moleculares envolvidos, além de comprometer a elucidação dos procedimentos que deveriam ser adotados na prevenção e no tratamento da doença (Liu et al., 2015; Ghosh, Levault & Brewer, 2014).

Dentre os diferentes fatores relacionados, a participação do estado de estresse oxidativo tem sido cada vez mais empregada, estimulando o direcionamento de investimentos crescentes no estudo deste campo e acendendo o interesse de pesquisadores da área.

No entanto, um problema central reside na imensidão de substância e/ou moléculas que podem ser caracterizadas como fonte de desequilíbrio na medida em que contribuem/estimulam a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Dentre elas, destaca-se a participação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) que, em recente revisão, foi considerado como um importante gerador de ROS a partir de suas ações mitocondriais (Vasquez et al., 2019), sugerindo que as alterações cardiovasculares amplamente descritas DA poderiam contribuir com o desenvolvimento e/ou a propagação dos danos inflamatórios centrais. Corroborando

esta suposição, segundo recentes revisões publicadas em concomitância à este projeto Kehoe (2018), Marfany et al., (2018) e Cooper et al. (2018), relatam a existência de uma complexa interação entre as doenças cardiovasculares e o desenvolvimento da disfunção cognitiva na doença de Alzheimer envolvendo, ainda, a constatação de que a angiotensina II está fisiologicamente exacerbada na maioria das doenças cardiovasculares em idosos.

Isto posto, ao definirmos a nossa justificativa de estudo da via do estresse oxidativo na demência da DA, o estudo de peptídeos angiotensinogênicos acrescenta um grau de complexidade ainda superior, tornando-se uma importante ferramenta a ser revista em futuras pesquisas. Dessa forma, o nosso foco na análise do papel do estresse oxidativo é, minimamente, a avaliação de um componente interiorizado em um completo sistema de mecanismos ainda mais complexos que envolvem o estresse oxidativo e a longevidade. Neste momento, o objetivo da presente tese restringe-se a tentar desvendar a contribuição deste para o agravamento e/ou desenvolvimento da demência e abrir avenidas pelas quais o nosso grupo e outros grupos de pesquisadores teremos o compromisso de caminhar.

De acordo com a teoria do estresse oxidativo, a morte neuronal na DA é secundária à presença de espécies reativas de oxigênio que atacam as células, modificando a sua composição lipídica, alterando a permeabilidade da membrana e, conseqüentemente, levando à modificações das funções de transporte e de barreira, predominantemente no que diz respeito à passagem de íons cálcio com alteração do processo de transdução do sinal neuronal (Su et al., 2008). O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre o processo bioquímico que leva à produção de ROS e àquele responsável pela sua remoção (Harman, 1981). Sob condições fisiológicas, a produção de ROS é uma consequência normal dos processos celulares que são estritamente controlados por mecanismos antioxidantes, incluindo a glutatona, o α -tocoferol, carotenóides e o ácido ascórbico, assim como por enzimas como a catalase e a glutatona peroxidase (Yu, 1994). No entanto, quando os níveis de ROS excedem a capacidade antioxidante de uma célula, ocorre o dano molecular e levando a uma disfunção celular crítica. (Yu, 1994). Sabe-se, ainda, que o tecido cerebral é particularmente vulnerável ao estresse oxidativo, uma vez dado o seu baixo nível de compostos antioxidantes, a sua alta concentração de ácidos graxos poli-insaturados e sua elevada demanda de oxigênio (Su et al., 2008).

A origem descrita da neurodegeneração da DA dá-se na presença dos oligômeros solúveis do peptídeo β -amilóide (A β Os) que induzem à disfunção sináptica

secundária à perda e distrofia das espinhas dendríticas, desestabilizando as proteínas do citoesqueleto dos dendritos, diminuindo a expressão de debrina e aumentando a expressão de espinofilina (Liu et al., 2015). Os AβOs ligam-se a um receptor putativo e ativam o receptor da tirosino-quinase EPHA4 e Fyn, com ativação aberrante de receptores N-metil D-Aspartato (NMDA) e aumento anormal de Ca^{2+} pós-sináptico. Os eventos seguintes incluem o aumento da geração de espécies reativas de oxigênio, a peroxidação da membrana lipídica e a fragmentação mitocondrial com expressão de superfície alterada e desregulação da função do receptor, excitotoxicidade, retração dendrítica e alteração de sinal neuronal com disfunção dopaminérgica (Su et al., 2008, Liu et al., 2015, Yiannopoulou & Papageorgiou, 2020)

Interessantemente, diversos estudos evidenciam que o estresse oxidativo precede as manifestações neuropatológicas cardinais da DA (Liu et al., 2015; Ghosh, Levault & Brewer, 2014;) De acordo com Liu e colaboradores (2015), os danos oxidativos são acompanhados de tentativas de apoptose e regeneração celular, ambas como um fenômeno precoce, antes da formação de placas senis e emaranhados neurofibrilares. Su e colaboradores (2008) corroboram este achado, reiterando que as placas senis e os emaranhados neurofibrilares são uma resposta fundamentalmente adaptativa, marcada pelo sequestro de metais redox-ativos pelas placas senis e pelo reconhecimento crescente de que os neurônios com inclusões são protegidos da morte celular imediata.

O estudo da influência do excesso de estresse oxidativo na contribuição do desenvolvimento e agravamento da demência clínica na DA vem, ainda, a corroborar os achados de pesquisa do laboratório da Universidade Federal do Espírito Santo nas últimas duas décadas envolvendo a participação das ROS nas alças patológicas de diversas outras doenças crônicas. Vasquez et al. 2012; Vasquez et al., 2018; Vasquez et al., 2019; Vasquez et al, 2020; Meyrelles et al. (2011).

Finalmente, justifica-se o interesse em estudar o papel do estresse oxidativo em modelos humanos portadores de doença de Alzheimer tendo em vista as evidências clínicas e experimentais correlacionando o estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, disfunção sináptica, envelhecimento, apoptose e danos ao DNA nos estados de demência (Tonnes & Trushina, 2017; Kamat et al., 2016; Chen & Zhong, 2014; Martins et al, 2018).

1.4. Marcadores de inflamação na doença de Alzheimer

Outro importante contribuinte para o desenvolvimento e o agravamento clínico de doenças crônicas complexas (cardiovasculares, renais e neurodegenerativas) e que atua, majoritariamente, como um fator adicional ao estado de estresse oxidativo é o processo inflamatório crônico (Balez & Ooi, 2016; Balin & Hudson, 2014).

O sistema nervoso central (SNC), historicamente, era considerado um sítio imunologicamente privilegiado, tendo em vista a presença da barreira hematoencefálica (BHE) que, acreditava-se, impediria a entrada e saída de inúmeras moléculas, incluindo anticorpos circulantes na periferia, macrófagos e linfócitos (Bowman et al., 2018). Este conceito refletiu-se em uma regressão de pensamento, com a determinação primária de que a inflamação neuronal regional mantinha-se completamente independente àquela que ocorria fora do SNC.

No entanto, assim como ocorre no sistema cardiovascular, a disfunção endotelial tem sido um ponto de atração às pesquisas científicas envolvendo estresse oxidativo, processo inflamatório e longevidade. Esta afirmação baseia-se no fato de existirem evidências atuais que sugerem que a inflamação neurovascular é um importante ponto de partida na ativação dos processos de deterioração sináptica, estímulo à apoptose e manutenção de viabilidade celular. A presença de inflamação central reflexa às afecções sistêmicas é apoiada na constelação de sintomas que ocorrem em consequência de um processo infeccioso/inflamatório, caracterizando a adoção de padrões de doenças específicas que sugerem mecanismos de adaptação cortical (Bowman et al., 2018).

A literatura científica mundial é rica em estudos acerca do envolvimento de citocinas inflamatórias acompanhando a disfunção cognitiva associada à neuroinflamação e vasculoinflamação (Ano et al., 2020; Jardo et al., 2020; Manzine et al., 2020).

Dessa forma, é logicamente questionável a existência ou perspectiva de surgimento de medidas paliativas ou potencialmente curativas no que tange ao tratamento da DA.

1.5. A interação morfofuncional entre a microbiota intestinal e a função integrativa do sistema nervoso central

A microbiota intestinal representa, aproximadamente, 80% do montante de microorganismos que vivem em nosso organismo, totalizando, aproximadamente, 100 trilhões. A microbiota se instala no sistema digestório durante o período peri e pós

natal e atua, beneficamente em favor do hospedeiro, durante toda a vida. (Vasquez et al., 2019).

Os mecanismos direcionados à modulação do microbioma intestinal e análise do seu papel no desenvolvimento de doenças constitui um campo emergente de investigação científica, tendo ultrapassado, em números absolutos de fontes de pesquisa e objeto de publicação, diversas outras doenças de interesse social global. Conforme publicado por Vasquez e colaboradores (2020), o crescimento das pesquisas relacionados à disbiose intestinal como causa e/ou consequência de doenças crônicas complexas apresentou um avanço marcante, partindo de apenas 8 publicações científicas por ano em 2000 para, aproximadamente, 5 mil artigos em 2020.

Dessa forma, conclui-se acerca da mudança de definição e pré-conceituação acerca do papel da microbiota intestinal, com a inversão da ideia de que os microorganismos que compõem a microbiota são imprescindíveis para a manutenção do hospedeiro, com um importante papel na manutenção da saúde e na prevenção de doenças (Alam et al., 2018; Ticinesi et al, 2018; Ozawa et al, 2018). Tal dado é corroborado por evidências recentes de que o transplante fecal contendo uma composição específica da microbiota tem efeitos comprovadamente preventivos e curativos em diversas doenças sistêmicas e crônicas (Dominguez et al., 2018)

Evidências crescentes confirmam a existência de uma interação bidirecional entre a microbiota intestinal e a função cerebral (tabela 1) que, sabidamente, baseia-se em uma correlação neuroendócrina que engloba o eixo de modulação entre a adeno-hipófise, a glândula supra-renal e o intestino com um braço cerebral composto pela via simpática e por aferências e eferências vagais (Ton et al., 2018). Em síntese, conforme ilustrado na Figura 1, extraída de um artigo recentemente publicado por Vasquez e colaboradores (2019) a microbiota intestinal consiste em um ecossistema dinâmico que é influenciado por vários fatores, incluindo genética, metabolismo, idade, uso de antibióticos e dieta. Vários estudos tem demonstrado que a microbiota intestinal pode contribuir para a patogênese da DA, na medida em que amilóides derivados de bactérias do trato gastrointestinal podem se acumular em nível sistêmico e cerebral (Zhang et al., 2014; Martins et al., 2018), levando a um aumento do ROS e ativação do fator κ B nuclear (NF κ B), com regulação ascendente sobre o micro RNA 34a pro-inflamatório, que, por sua vez, reduz a expressão de TREM2 (triggering receptor expressed in microglial/myeloid cells 2), induzindo o prejuízo na função fagocítica e contribuindo com o acúmulo de proteína β -amilóide. Adicionalmente,

lipopolissacarídeos e amilóides bacterianos podem aumentar os níveis de citocinas e outras moléculas pro-inflamatórias sistemicamente (ver ilustração Figura 1) (Zheng et al., 2016).

Tabela 1: Exemplos de produtos não farmacológicos que foram estudados em pacientes com doença de Alzheimer e doenças correlacionadas. (Ton et al, 2018)

Indivíduos do estudo	Nutracêutico, alimento funcional ou suplemento	Desfecho final ou conclusão	Referência
Modelo animal com doença de Alzheimer	Resveratol	Supressão dos índices de p-s396-tau induzido por Na ₂ VO ₄ via ERK1/2 e GSK-3b	Jhang et al. (2017)
Mulheres idosas	Vitamina D	Redução do risco de desenvolvimento de demência.	Annweiler et al. (2012)
Modelo animal aterosclerótico	Kefir	Atenuação da deposição lipídica endotelial	Santanna et al. (2017)
Indivíduos idosos	Flavonóides	Redução do risco de desenvolvimento de demência	Commenges et al. (2000)
Modelo animal de hipertensão	Kefir	Redução da pressão arterial sistêmica, disautonomia cardíaca e barorreflexo.	Klippel et al. (2016)
Modelo animal com doença de Alzheimer	<i>Lactobacillus</i>	Atenuação das placas neuríticas e melhora da sintomatologia cognitiva.	Nimgampalle et al. (2017)
Homens idosos	Vitamina E e Vitamina C	Redução do risco de desenvolvimento de demência e melhora da sintomatologia cognitiva.	Masaki et al. (2002)
Indivíduos com doença de Alzheimer	Ômega 3	Melhora da sintomatologia cognitiva	Phillips et al. (2015)
Modelo animal de hipertensão	Kefir	Atenuação ou reversão da disfunção endotelial e redução de ROS	Friques et al. (2015)

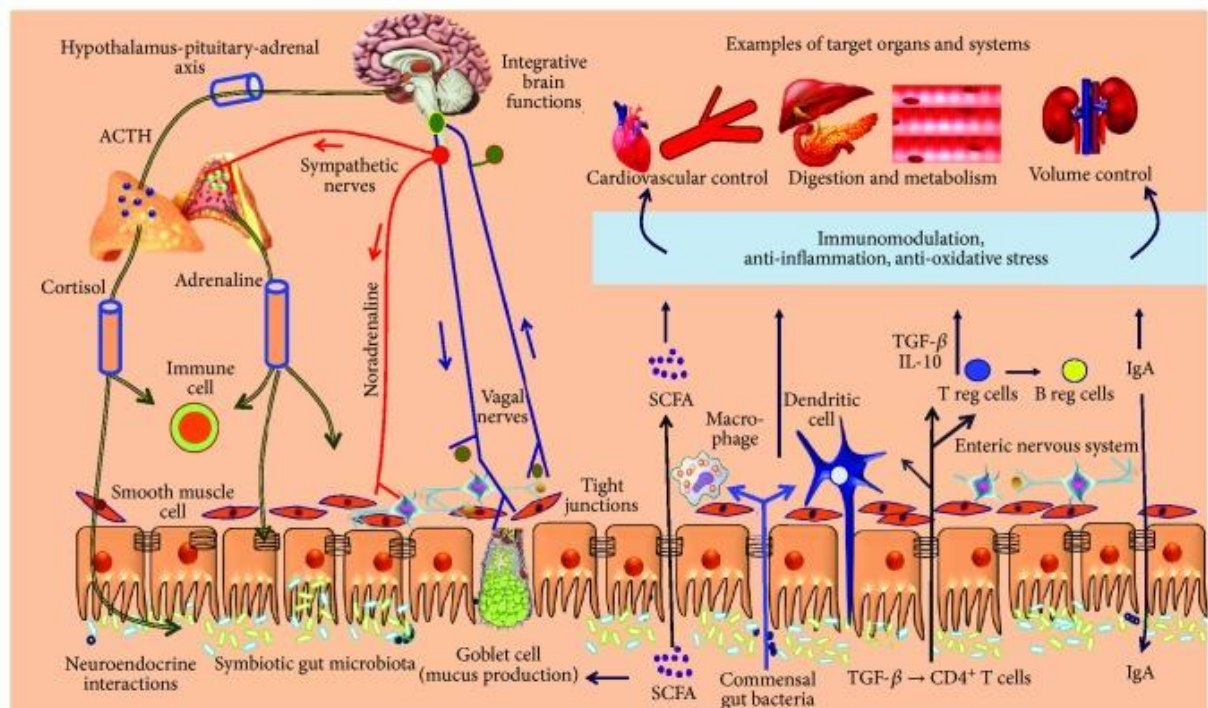


Figura 4: Interação entre a microbiota intestinal e os sistemas neuroendócrino e neuroimunes. A microbiota intestinal exerce efeito (i) de barreira por meio das *tight junctions* e dos enterócitos; (ii) imunomodulatório e anti-inflamatório, por meio do recrutamento do sistema imune e (iii) de produção de energia, via metabolismo dos ácidos graxos de cadeia curta, vitaminas e hormônios. (Vasquez et al, 2019)

1.6. Impacto do déficit cognitivo no dia-a-dia do paciente com doença de Alzheimer

A demência clínica é caracterizada por uma regressão cognitiva progressiva em relação ao estado de base do indivíduo, podendo afetar diferentes domínios funcionais, tais como: linguagem, habilidades construtivas e visuo-espaciais, memória, orientação, funções executivas, praxias, raciocínio e outros, a depender da reserva cognitiva acumulada durante a vida, da velocidade de evolução da doença e das áreas corticais envolvidas. O paciente com doença de Alzheimer é considerado clinicamente definido quando apresenta comprometimento progressivo em pelo menos dois domínios não explicado pela presença de lesões isquêmicas e/ou estruturais ou em consequência de distúrbios metabólicos e do humor com impacto funcional (Sharma et al., 2020; McKhann et al., 2011) .

O desenvolvimento do dano cognitivo impacta, ainda, nos níveis de dependência funcional para a realização das atividades simples e complexas de vida diária que podem ser medidas pelo tempo gasto por parte de terceiros no auxílio e/ou assistência durante a realização destas tarefas. Segundo a Alzheimer's Association, o

tempo médio gasto, por parte de terceiros, com os cuidados com o paciente com DA é de, aproximadamente, 21,9 horas de cuidado por semana ou 1.1139 horas por ano . (GBD 2016 Dementia Collaborator, 2019).

Por estes motivos, definimos como o objetivo majoritário da tese a análise da melhora cognitiva destes pacientes, sob influência da atenuação do dano oxidativo e inflamatório com o objetivo de mitigar o impacto funcional da doença e reduzir a os índices de dependência e institucionalização.

1.7. Desafios no tratamento da doença de Alzheimer

Apesar de todos os esforços direcionados no desenho de pesquisas clínicas que objetivam desenvolver ferramentas terapêuticas eficazes na redução do nível de dependência funcional e na atenuação dos sintomas cognitivos, atualmente, conta-se com apenas 4 medicações autorizadas pela Food and Drug Administration (FDA) para atuação em pacientes com DA que, entanto, apresentam resposta clínica incompleta. (GBD 2016 Dementia Collaborator, 2019).

Hoje, existem 129 estudos em andamento na tentativa de desenvolver ferramentas terapêuticas eficazes no tratamento de doença de Alzheimer No entanto, contrariamente às expectativas, de 1998 a 2018, 152 estudos clínicos falharam no que tange ao desfecho cognitivo. (Cumming et al., 2019; Doody, 2017).

2019 Alzheimer's Drug Development Pipeline

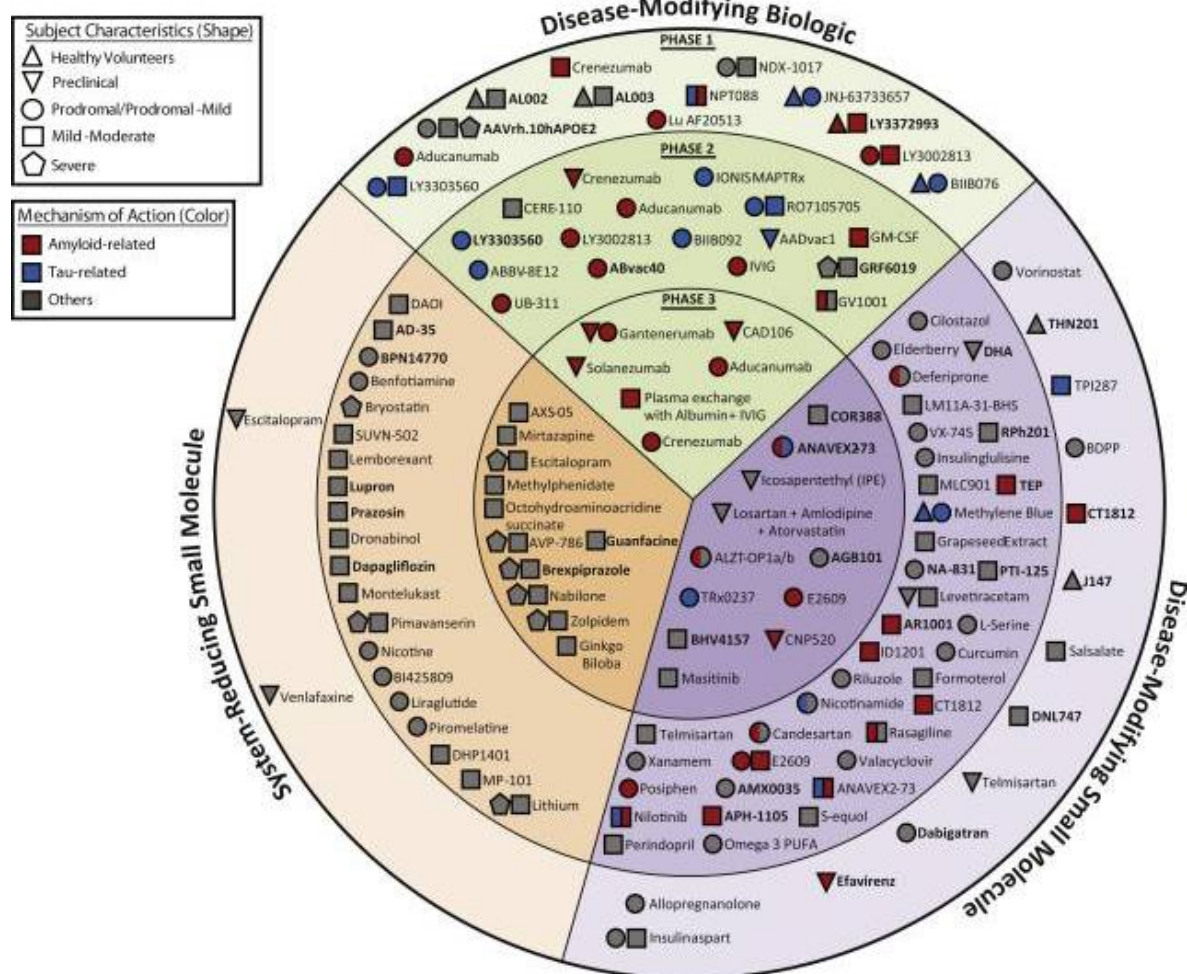


Figura 5: Esquema descritivo demonstrando os estudos clínicos atualmente em andamento desenvolvidos com o objetivo de testar novas drogas no tratamento da DA.

Nosso laboratório tem demonstrado os benefícios associados à administração de suplementos nutricionais, também conhecidos como nutracêuticos, no tratamento de doenças crônicas complexas. Dentre eles, o uso de probióticos/prebióticos tem se revelado como uma ferramenta pouco custeosa e eficaz na atenuação de sintomas clínicos em variadas doenças (Vasquez et al., 2019).

Os probióticos, definidos pela Food and Agriculture Organization como microorganismos vivos que, quando administrados em quantidade adequada, conferem benefícios à saúde do hospedeiro, tem sido considerados uma fonte emergente e efetiva de antioxidantes (Mishra et al., 2015). De acordo com Mishra e colaboradores (2015), os probióticos podem aumentar a atividade de enzimas antioxidantes, incluindo a glutathione-S-transferase (GSH), glutathione, glutathione-reductase, glutathione peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD) e catalase

(Mishra et al., 2015). Segundo Valentini e colaboradores (2013), os probióticos podem reduzir o estresse oxidativo atuando na produção de citocinas, diminuindo os índices de interleucina 1 (L-1) e do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e aumentando os níveis de glutathione (Valentini et al., 2013). Além disso, existem evidências demonstrando que a suplementação com probióticos pode estimular o crescimento de populações de *Bifidobacterium*, enquanto, concomitantemente, reduzem o crescimento de enterobactérias (Perez Martinez, Bauerl & Collado, 2014). Conclui-se, portanto, que os probióticos, por meio da modulação da composição do microbioma intestinal, podem melhorar ou prevenir a inflamação intestinal e sistêmica.

O leite fermentado com kefir é um alimento funcional originário do norte do Cáucaso que, atualmente, pode ser distribuído comercialmente em todo o mundo em países como Rússia, Espanha, Alemanha, Estados Unidos, Canadá e Brasil (Leite et al., 2013; Friques et al., 2015; Pereira et al., 2016; Rosa et al., 2017; Amorim et al., 2019). A fermentação do leite é mediada pela exposição aos grãos de kefir, que são compostos por elementos bioativos (peptídeos, vitaminas e polissacarídeos) gerados, originalmente, pelas bactérias ácido-láticas e leveduras presentes nesses grãos (Friques et al., 2015; Pereira et al., 2016; Amorim et al., 2019; Barboza et al., 2018; Pimenta et al., 2018).

Estudos comprovam (Figura 2) que a administração de kefir e/ou seus bioprodutos é capaz de prevenir disfunções cardiovasculares em modelos animais experimentais de hipertensão (Friques et al., 2015; Amorim et al., 2019; Klippel et al., 2016), aterosclerose (Santanna et al., 2017) e úlceras gástricas (Barboza et al., 2018) em consequência de suas propriedades antioxidantes e imunomoduladoras. Além disso, existem evidências que indicam que o uso de probióticos modula efetivamente o microbioma (Ton et al., 2018). Claramente, a ação probiótica pode ser amplificada combinando-se com prebióticos, uma combinação que resulta nos chamados simbióticos (Vasquez et al., 2019).

De maneira interessante, estudos prévios evidenciaram que a ação do kefir não requer, necessariamente, a presença dos microorganismos vivos, tendo em vista que a fração não bacteriana solúvel do kefir tem o mesmo efeito benéfico na disbiose intestinal em relação àquele obtido pela ingestão do leite fermentado contendo os microrganismos. (Brasil et al., 2018).

No entanto, o uso de simbióticos com o objetivo de modulação inflamatória e atenuação clínica em indivíduos com doença de Alzheimer, ainda não foi testado.

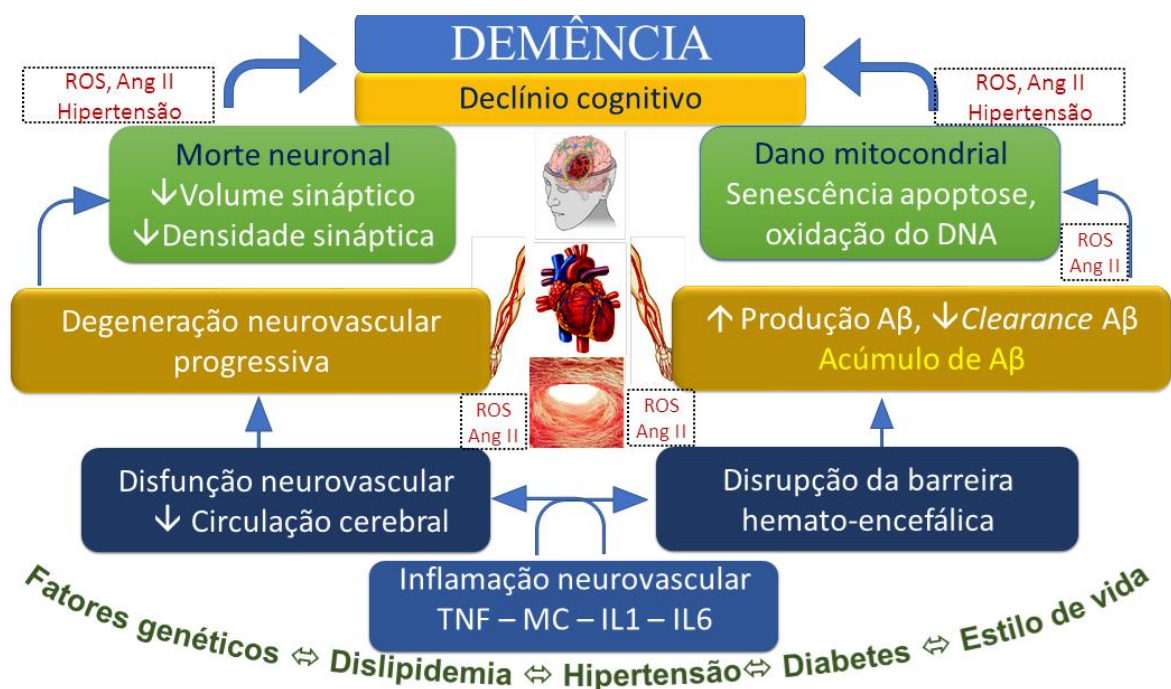


Figura 2: Esquema demonstrando os principais mecanismos em evidência relacionados à deterioração cognitiva e neuropatológica e à inflamação em pacientes com síndrome demencial.

1.8. Justificativa da pesquisa

A dramaticidade do dano cognitivo, em consonância com a escassez de ferramentas terapêuticas eficazes para o tratamento da sintomatologia da doença de Alzheimer e as descobertas científicas atuais demonstrando o importante papel das espécies reativas de oxigênio e do estado inflamatório, reveladas sinteticamente acima, sugerem um caminho a ser percorrido.

Embora o uso de suplemento alimentar composto de microorganismos de marcante atuação positiva sobre a microbiota intestinal, especialmente o kefir, tenha sido testado em diversas doenças crônicas, estas pesquisas ainda não haviam sido expandidas ou aplicadas em doenças cerebrais relacionadas com a disfunção neurovascular degenerativa em humanos.

A varredura de literatura supunha o possível efeito modulatório do microbioma intestinal sobre a inflamação sistêmica e a neutralização de espécies reativas de oxigênio, por mecanismos ainda não completamente esclarecidos. Todavia, ao extrapolar estes dados, a nossa hipótese seria de que a suplementação simbiótica com leite fermentado com kefir, com seus efeitos probióticos e prebióticos, seriam capazes de combater a disbiose intestinal em indivíduos com DA, com prováveis

efeitos benéficos sobre a deterioração cognitiva e atenuação da inflamação sistêmica com neutralização das ROS.

2. OBJETIVOS

Os nossos objetivos definidos foram, portanto, de maneira geral, determinar a relação causal entre o uso de simbióticos e atenuação da sintomatologia cognitiva em pacientes com doença de Alzheimer. Especificamente, objetivamos definir uma afinidade de correlação entre o estado cognitivo após a suplementação e redução dos níveis de citocinas inflamatórias e de espécies reativas de oxigênio quantificadas e avaliar o impacto do uso do simbiótico na viabilidade celular.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Casuística

Foram incluídos na pesquisa pacientes com DA selecionados por amostragem de conveniência. O diagnóstico de DA foi firmado conforme os critérios de diagnóstico de demência clínica secundária à provável doença de Alzheimer com alto nível de certeza definido pela Alzheimer Association e pelo National Institute of Aging (NIA) publicados em 2011 (McKhann et al., 2011) caracterizados pela presença de declínio cognitivo progressivo insidioso ou alteração comportamental envolvendo pelo menos dois domínios cognitivos (memória, linguagem, atenção ou habilidades construtivas) com comprometimento funcional das atividades habituais. Os sintomas não poderiam ser explicados por delirium ou distúrbios psiquiátricos.

A pesquisa foi aprovada pelo comitê de ética da Universidade de Vila Velha (nº 1.804.392), e um termo de consentimento livre e esclarecido assinado foi obtido de cada um dos sujeitos e / ou de seus tutores após esclarecimento acerca da natureza da pesquisa e dos possíveis riscos e benefícios envolvidos. (Anexo A)

A amostra incluiu indivíduos de ambos os sexos, sem restrição de idade, atendidos em um centro de referência em Vila Velha, Espírito Santo, Brasil, especializado em DA. Os critérios de inclusão foram: (1) ausência comorbidades neurológicas e/ou psiquiátricas prévias associadas a comprometimento cognitivo, (2) ausência de depressão clínica e/ou detectada por meio da escala de Hamilton (Anexo B) e (3) ausência de comorbidades clínicas (diabetes descompensado, doenças autoimunes, neoplasias e/ou doenças inflamatórias intestinais).

Os critérios de exclusão atribuídos na pesquisa foram: (1) incapacidade orgânica ou ambiental de submeter-se à suplementação simbiótica, (2) uso de drogas com impacto neurocognitivo e (3) uso de inibidor de acetilcolinesterase em dose inferior à 10mg/dia.

Inicialmente, trinta e quatro indivíduos preencheram os critérios de inclusão. No entanto, dezoito indivíduos foram excluídos imediatamente tendo em vista o diagnóstico associado de depressão clínica (três sujeitos), diabetes descompensada (seis sujeitos) e devido à necessidade de antibioticoterapia e/ou hospitalização durante o seguimento (nove sujeitos). Adicionalmente, 3 dos 16 pacientes arrolados morreram e, finalmente, um total de 13 indivíduos completou o tempo total do experimento, tendo recebido a suplementação simbiótica durante 90 dias (Figura 3)

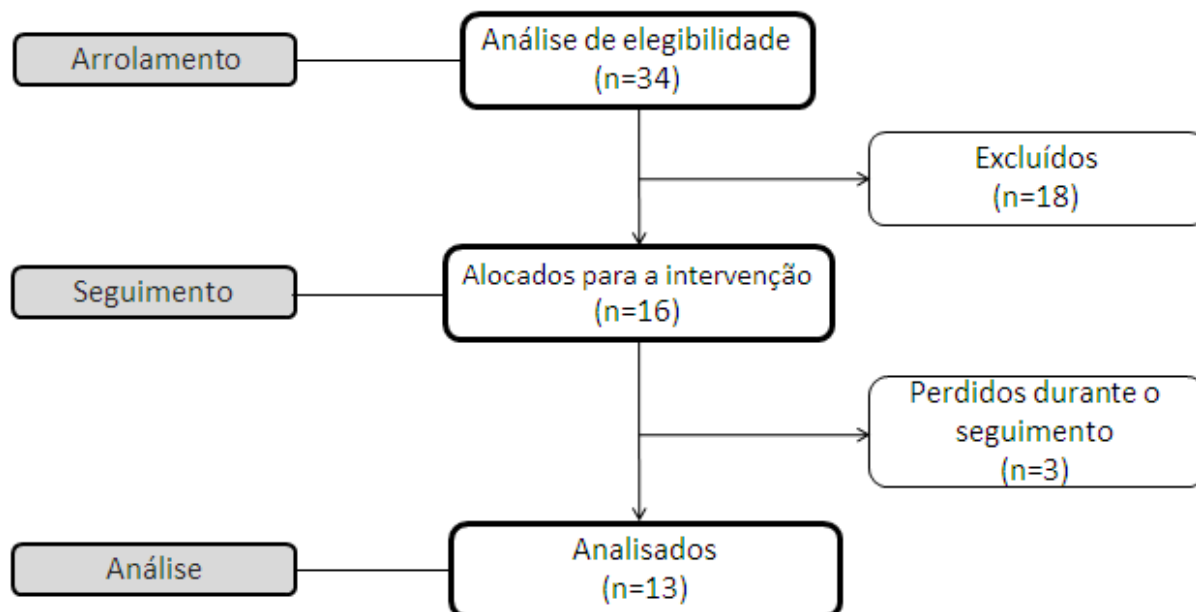


Figura 3: Etapas envolvidas na seleção da amostra final.

3.2. Preparação do leite fermentado com kefir

A bebida fermentada foi preparada, diariamente, por meio da inoculação de leite pasteurizado com grãos de kefir a 4%, contendo as espécies *Acetobacter aceti*, *Acetobacter sp.*, *Lactobacillus delbrueckii delbrueckii*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus fructivorans*, *Enterococcus faecium*, *Leuconiracofus spac.* e incubação a 25 ° C – 28 ° C por 24 h. Após o período de incubação, o produto fermentado foi filtrado e refrigerado a 2 ° C – 6 ° C por 24 horas. Ao produto final foi, então, adicionado de 500 g de morangos orgânicos para cada 2 litros da bebida a fim de melhorar as características organolépticas e garantir a adesão à suplementação. O leite fermentado por kefir foi fornecido na dose de 2ml/kg/dia.

3.3. Avaliação cognitiva

A avaliação cognitiva foi feita antes (T0) e após 90 dias (T90) da suplementação simbiótica, por meio da aplicação da bateria de testes recomendada pelo Departamento de Neurologia Cognitiva e Envelhecimento da Sociedade Brasileira de Neurologia para o rastreamento de síndromes demenciais (Nitrini et al., 2005) , bem como pela a Sociedade Americana de Neurologia (Knopman et al., 2001) e pelo

Instituto Nacional de Envelhecimento e Associação de Alzheimer (McKhann et al., 1984).

Por este método, foram analisadas as seguintes funções: “funções cognitivas globais”, usando o (1) Mini-Exame do Estado Mental (MEEM) apresentado na Figura 4; “Memória” por meio da utilização de um quadro de recordação com 10 objetos concretos (Figura 5) a fim de aplicar o (2) teste de memória imediata e (3) o teste de memória tardia, de acordo com as recomendações de Nitrini e colaboradores (2005) na avaliação de grupos com diferentes níveis de escolaridade; “Habilidades visuais-espaciais e de abstração”, usando o (4) Prancha do Roubo de Biscoitos (PRB) (Figura 6), de acordo com as recomendações consensuais publicadas (Nitrini et al., 2005) sugerindo o uso de descrição de figuras temáticas justificadas pela ausência de estudos na área com a população brasileira e pelo (5) Teste de Similaridade, utilizando as recomendações publicadas (Nitrini et al., 2005) para aplicar a subseção NEUROPSI onde o entrevistado é solicitado a identificar a semelhança entre três pares de substantivos (laranja e pêra, cachorro e cavalo e olho e nariz) e pontuado conforme o número de acertos; “Funções executivas e de linguagem”, usando o (6) Teste de Nomenclatura de Boston, cujas imagens apresentadas encontram-se descritas na Figura 7, e (7) teste de fluência verbal; “Atenção”, usando o (8) Teste de Trilhas A (Figura 8) que orienta a conexão correta entre os números em ordem cronológica e pontua conforme o número de acertos em 120 segundos; e “habilidades visuoespaciais”, usando o (9) teste do desenho do relógio pontuado conforme descrito na Figura 9.

Com o objetivo de evitar o efeito de aprendizado, os testes de avaliação cognitiva foram espaçados por 90 dias e os vários testes de domínio foram aplicados em uma ordem diferente a cada análise.

escore	1) Orientação
5	ano -- mês -- dia do mês -- dia da semana -- hora aproximada
5	estado -- cidade -- hospital -- andar (setor) -- consultório
	2) Registro
3	pente -- vaso -- laranja Tentativas _____ (máx. 6)
	3) Atenção e Cálculo
5	seriado descendente de 100-7: 93 -- 86 -- 79 -- 72 -- 65 - alternativa, se impossível cálculo: soletrar "mundo" de trás para frente (assinale se pontuou soletração □)
	4) Recordação
3	recordar as 3 palavras dadas para Registro
	5) Linguagem
2	denominar um relógio de pulso e uma caneta
2	repetir "nem aqui, nem ali, nem lá"
3	atender ao comando em 3 etapas: " <i>pegue o papel com a mão direita, dobre-o ao meio e ponha-o no chão</i> " (use essa folha)
1	ler e obedecer o seguinte: " <i>Feche os Olhos</i> " (vide verso)
1	escrever uma frase
1	copiar o desenho
/30	Escore total

Figura 4: Registro de análises incluídas no Mini Exame do Estado Mental (MEEM), identificando as habilidades pesquisadas durante a bateria cognitiva e o critério de pontuação. (Adaptado de Nitrini et al., 2005.)



Figura 5: Quadro de recordação utilizado durante a bateria cognitiva. O indivíduo é convidado a memorizar todos os objetos durante 120 segundos apresentados e evocar o maior número possível em um primeiro (memória imediata) e um segundo momento (memória tardia). (Adaptado de Nitrini et al., 2005.)



Figura 6: Imagem utilizada na avaliação das habilidades visuo-espaciais. Apresenta-se a cena ao indivíduo, que é solicitado a descrever minuciosamente o que é observado, pontuando-se o número de acertos. (Adaptado de Nitrini et al., 2005.)

	DESENHO	REPOSTA	INCORRETA	CORRETA
Alta frequência	Árvore		0	1
	Cama		0	1
	Apito		0	1
	Flor		0	1
	Casa		0	1
Média frequência	Canoa		0	1
	Escova dentes		0	1
	Vulcão		0	1
	Máscara		0	1
	Camelo		0	1
baixa frequência	Gaita		0	1
	Pinça de gelo		0	1
	Rede		0	1
	Funil		0	1
	Dominó		0	1

Figura 7: Prancha de pontuação do Tesde de Nomenclatura de Boston. O indivíduo é apresentado às imagens dos itens supradescritos em uma tela digital, devendo descrever o nome dos objetos ou sua função em até 10 segundos. (Adaptado de Nitrini et al., 2005.)

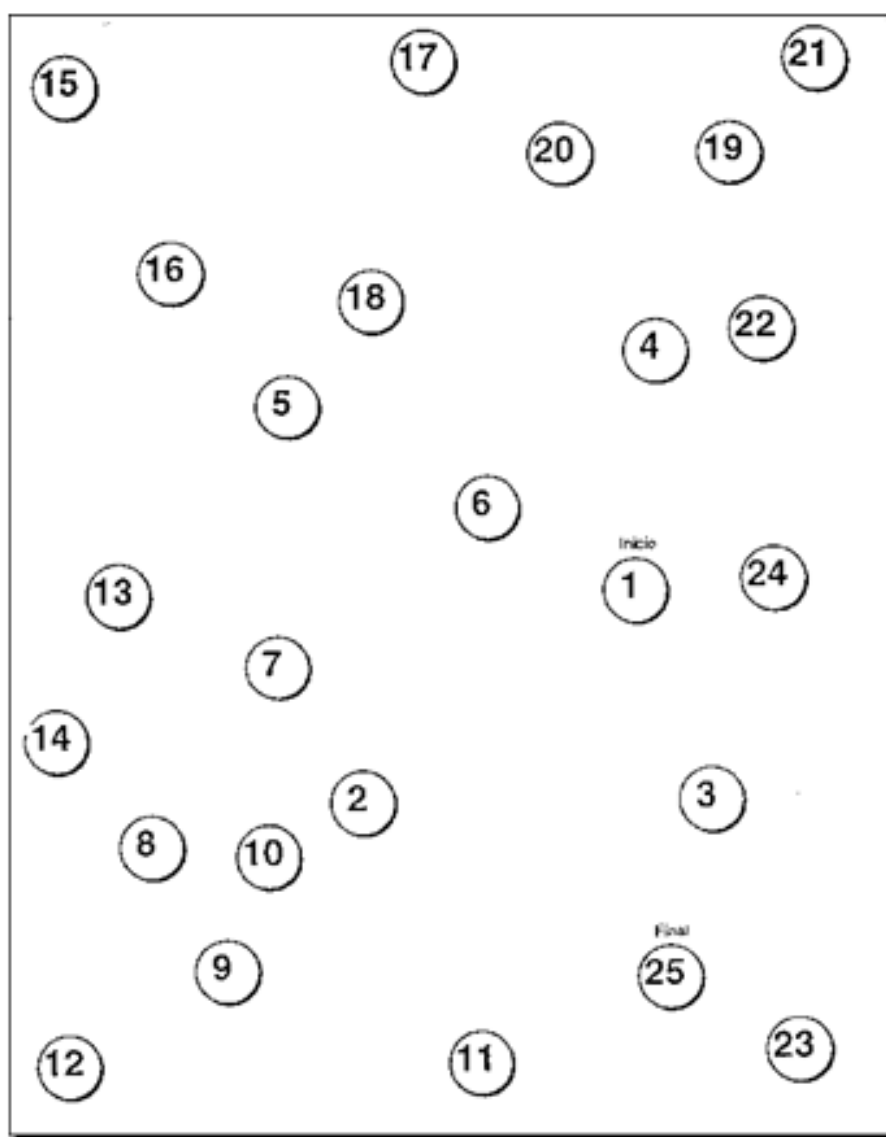


Figura 8: Imagem utilizada na aplicação do Teste de Trilhas A. Durante esta análise, o indivíduo deve desenhar uma linha conectando os números na ordem crescente. Pontua-se os acertos em 120 segundos. (Adaptado de Nitrini et al., 2005.)

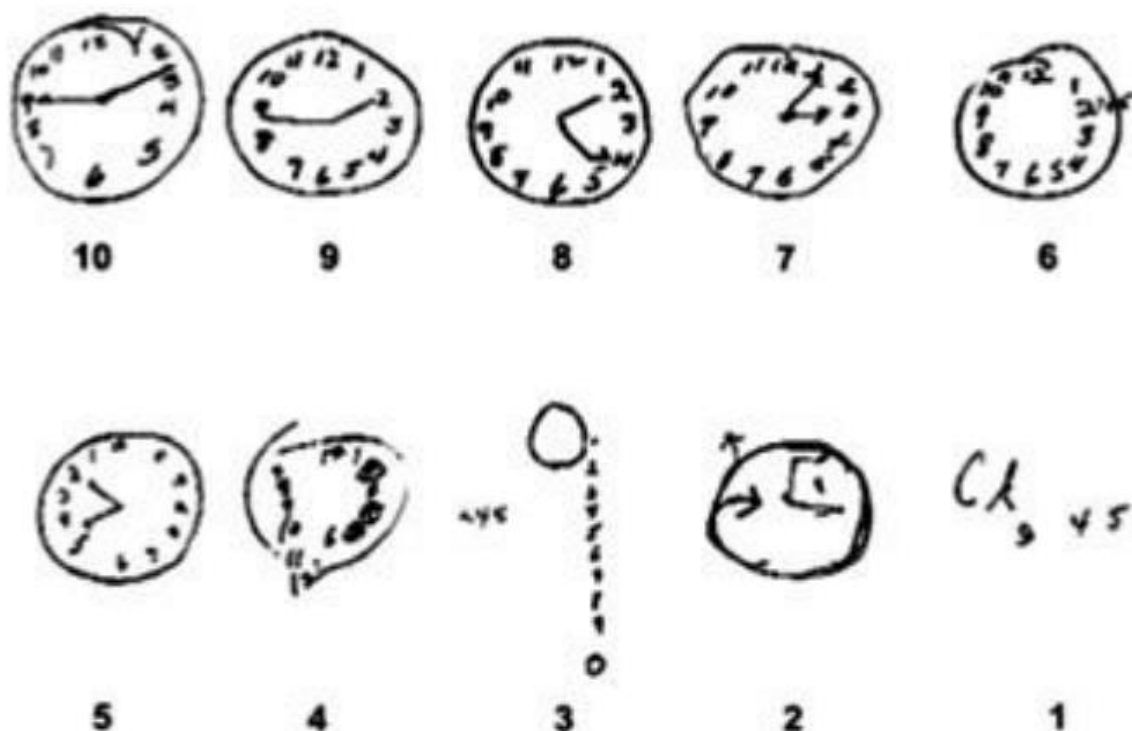


Figura 9: Ilustração demonstrando a classificação dos possíveis resultados obtidos na aplicação do teste do desenho do relógio. Pede-se ao indivíduo que desenhe um relógio analógico, cujos ponteiros estão marcando 14:45hs. (Adaptado de Nitrini et al., 2005.)

3.4. Dosagem de citocinas

As concentrações das citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-8, IL-1b, IL-12p70, e TNF- α) e anti-inflamatórias (IL-10) foram analisadas utilizando-se de um kit de inflamação humana Cytometric Bead Array (CBA, BD Biosciences, USA) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram analisadas por meio da aplicação da técnica de citometria de fluxo, usando um FACSCanto II (BD, San Jose, CA, USA). A aquisição dos dados foi realizada por intermédio do software FACSDiva (BD) e a análise dos eventos foi feita com o auxílio do software FCAP Array software (BD). As amostras foram medidas em comparação com as curvas padronizadas de citocinas recombinantes utilizando-se o FCAP Array software (BD). Todos os resultados foram expressos em pg/mL.

3.5. Quantificação de ROS

A quantificação de ROS foi realizada por citometria de fluxo, usando utilizando-se um instrumento FACSCanto II (Becton Dickinson, BD, CA, EUA) para analisar o conteúdo intracitoplasmático, conforme descrito nosso grupo anteriormente (Barboza

et al., 2018; Campagnaro et al., 2013; Porto et al., 2015). Em um primeiro momento, foi feita a coleta do material biológico por meio da punção venosa periférica com posterior indução de lise eritrocitária através da adição, ao conteúdo coletado, de cloreto de amônio. O ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical peroxinitrito/hidroxila ($ONOO^-/OH^\bullet$) e o óxido nítrico ($NO^\bullet$) foram monitorados separadamente por meio da medição da modificação na intensidade de fluorescência média (MFI) emitida pela di-hidroetidina (DHE), diclorofluoresceína (DCF), hidroxifenil fluoresceína (HPF) e diaminofluoresceína (DAF), respectivamente.

De forma resumida, um total de 10^6 leucócitos foram incubados com 160 mmol/L de DHE, 20 mmol/L de DCF, 10 μ mol/L de HPF ou 2 μ mol/L de DAF a 37 ° C por 30 minutos (DHE, DCF e HPF) ou 180 minutos (DAF) em ambiente escuro. As amostras foram lavadas, ressuspensas em PBS e mantidas em gelo até a aquisição de 10.000 eventos por citometria de fluxo, que foram posteriormente analisados pelo software FCS Express (De Novo).

3.6. Avaliação de viabilidade celular

O índice de apoptose celular foi determinado, igualmente, por meio de citometria de fluxo, utilizando-se o kit de detecção de apoptose da anexina V-FITC/PI (BD Bioscience) de acordo com as instruções do fabricante. Desta forma, 10^6 células sanguíneas foram ressuspensas em uma substância tampão e incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente, em ambiente escuro, com 5 mL de anexina V-FITC e 5 mL de iodeto de propídio (PI). Os resultados foram definidos por intermédio de um citômetro de fluxo FACSCanto II (BD) e analisados pelo software FCS Express (De Novo).

As células duplamente negativas foram consideradas viáveis, enquanto as células positivas para a anexina V-FITC foram consideradas apoptóticas (Barboza et al., 2018; Campagnaro et al., 2013; Porto et al., 2015). Os dados foram expressos em percentual de células apoptóticas.

3.7. Avaliação estatística

Todos os dados foram expressados em média $\pm$ erro padrão da média (com exceção das características demográficas, expressas em média $\pm$ desvio padrão). O teste de Kolmogorov-Smirnov foi aplicado para avaliar a normalidade dos dados. Considerando que todos os sujeitos exibiam distribuição Gaussiana, o teste t de Student para amostras pareadas foi utilizado na análise estatística da quantificação

de citocinas, dosagem de ROS e índice de viabilidade celular antes e após a administração do simbiótico.

Os valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos. A análise estatística foi realizada utilizando-se o software GraphPad Prism versão 7.0.

4. RESULTADOS

3.1 Características dos pacientes (demográficas, antropométricas e sociais)

A tabela 2 revela as características clínicas dos sujeitos analisados. Não foram observadas diferenças significativas entre os homens e as mulheres no que diz respeito ao gênero, idade, índice de massa corporal (IMC), duração do tratamento e nível de escolaridade.

Tabela 2: Características demográficas dos pacientes.

Parâmetros	Mulheres (n= 11)	Homens (n=2)	p
Idade (anos)	78.7 ± 3,0	78 ± 7	0.93
IMC (kg/m ²)	25.8 ± 0.6	27±1.7	0.61
Nível educacional (anos)	5.9 ± 0.6	5±1.0	0.51
Duração do tratamento (anos)	1.85 ± 0.7	0.6 ± 0.1	0.08
*Os valores foram expressados em média ± desvio padrão.			

4.2 Avaliação cognitiva

A Figura 10 resume os resultados obtidos após a aplicação das baterias cognitivas nos momentos T0 e T90. Observa-se uma melhora significativa no desempenho dos sujeitos no MEEM em 28% (T0: 17:4 ± 1:03 acertos e T90: 22:3 ± 0:82 acertos, $p < 0.0001$), confirmando o impacto positivo da suplementação do leite fermentado com kefir no desempenho cognitivo global (Figura 10 (a)). Um impacto semelhante foi observado na memória (Figura 10 (b), painel esquerdo) através do teste de memória imediata (~ 66%, $p < 0.05$) e do teste de memória tardia (~ 62%, $p < 0.05$) entre T0 e T90.

No centro da figura 10 (b), demonstra-se importante benefício nas habilidades visuo-espaciais e na capacidade de abstração utilizando-se o Teste de Similaridade (aumento de ~ 2 vezes, $p < 0.05$) e o Teste da Prancha do Roubo de Biscoitos (aumento de ~ 2 vezes, $p < 0.05$). Com relação às funções executivas e de linguagem (Figura 10 (b), painel direito), também observa-se um incremento significativo no Teste de Boston (~ 30%, $p < 0.05$) e no teste de fluência verbal (~ 25%, $p < 0.05$).

Por fim, confirma-se uma melhora significativa nas habilidades construtivas, evidenciadas pela melhora no teste de relógio (T0: 9:0 ± 2:4 acertos e T90: 13:2 ± 2:3 acertos, $p < 0.05$), e na atenção testemunhada pelos resultados extraídos do Trail Making Test (40%, $p < 0.05$).

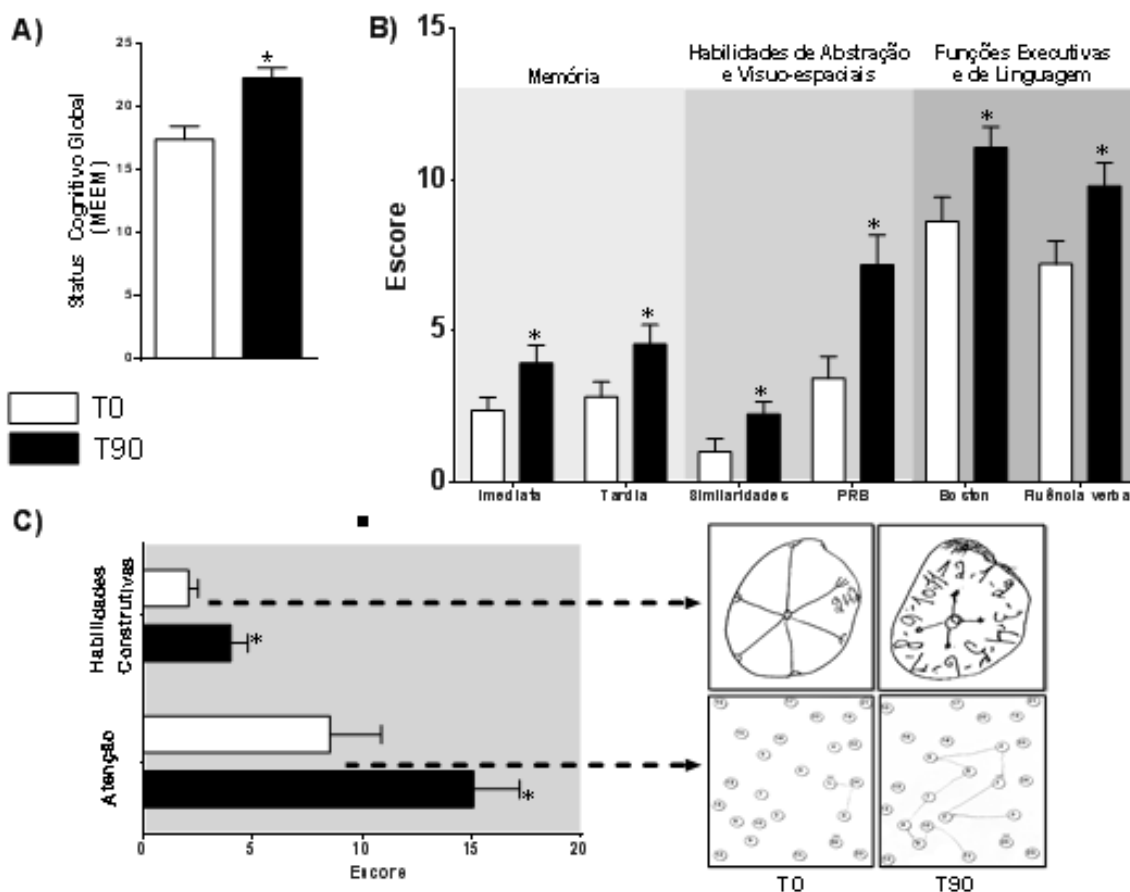


Figura 10: Série de painéis demonstrando os resultados da bateria cognitiva antes e após o tratamento utilizando kefir. (a) Estado cognitivo global (através da aplicação do MEEM, comparando o efeito do tratamento com os valores previamente observados). (b) Análise de memória (imediate e tardia, à esquerda), habilidades visuo-espaciais e de abstração (através da aplicação do Teste de Similaridades e da Prancha do Roubo de Biscoitos, ao centro) e das funções executivas e de linguagem (através da aplicação do Teste de Nomenclatura de Boston e da Fluência Verbal, à direita). (c) Habilidades construtivas e de atenção, com a demonstração dos desenhos típicos apresentados pelos pacientes durante a análise. Os resultados foram expressados em média ± SEM ($n = 13$). * $p < 0.05$ em comparação à T0.

4.3 Avaliação de citocinas inflamatórias

A Figura 11 revela a quantificação das citocinas envolvidas na patogênese de doenças neurodegenerativas. Os níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-8 e IL-12p70) foram mais baixos em T90 do que em T0 (diminuição de 1,5 vezes, respectivamente). No entanto, outras citocinas pró-inflamatórias (como IL-1b e IL-6) ou anti-inflamatória (IL-10) não apresentaram diferença entre T90 e T0. Curiosamente, analisando a proporção entre as citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (Figura 11 (g)), verifica-se que a suplementação com simbióticos foi capaz de reduzir os índices IL-8/IL-10 e IL-12/IL-10 (T0: 2.3 ± 0.2 vs. T90: 1.7 ± 0.1 pg/mL e T0 : 0.95 ± 0.05 vs. T90: 0.72 ± 0.08 pg/mL, respectivamente, $p < 0.05$).

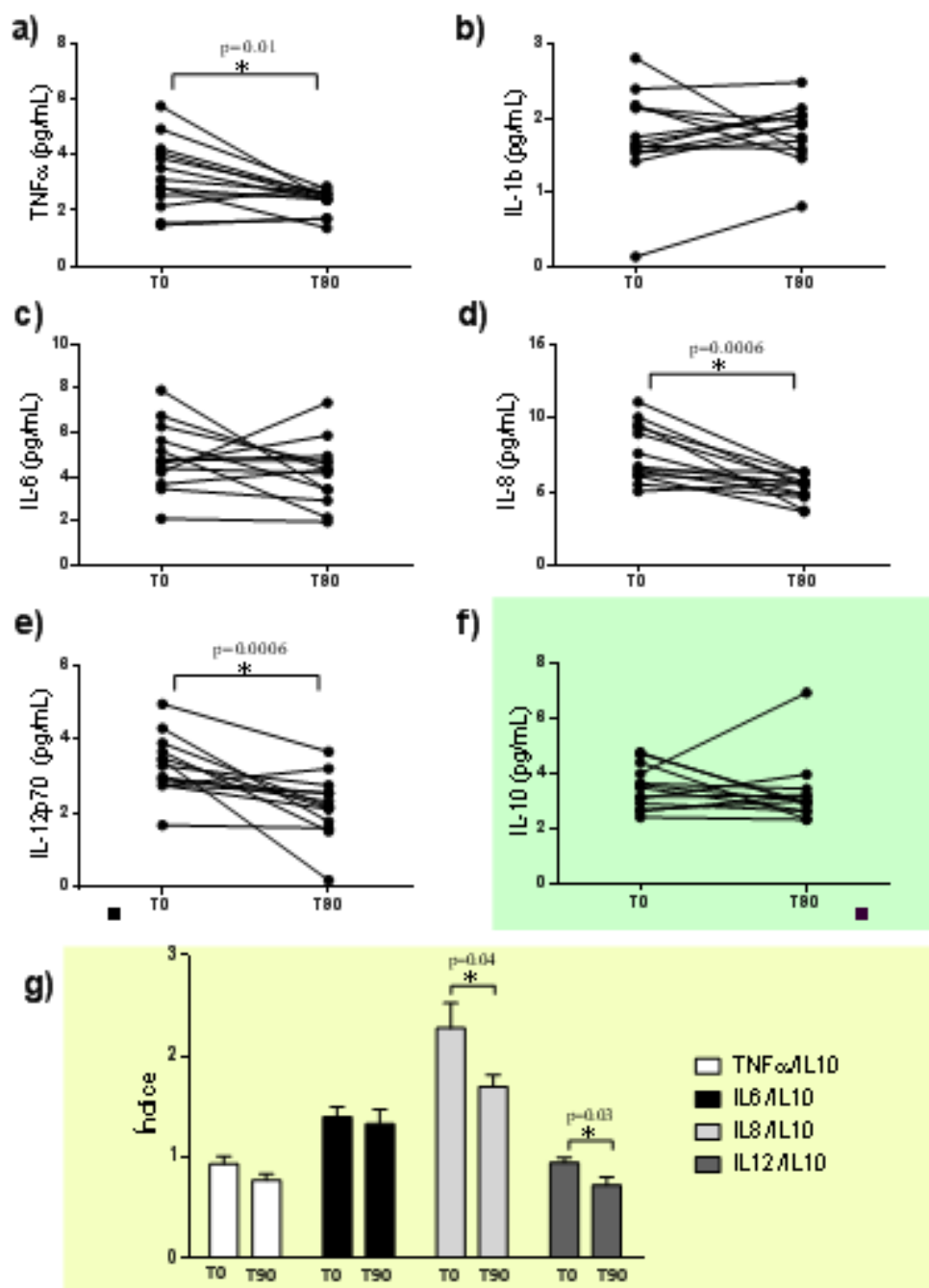


Figura 11: Níveis de citocinas medidos por Cytometric Bead Array (CBA) utilizando o protocolo realizado por análise de citometria de fluxo. Os valores de concentração de TNF- α (a), IL-1b (b), IL-6 (c), IL-8 (d), IL-12p70 (e), IL-10 (f) e o índice da razão entre os marcadores pró inflamatórios e os marcadores anti-inflamatórios (g) foram medidos antes e após a suplementação simbitótica. Os resultados foram expressados em $\pm$ SEM ($n = 13$). $*p < 0.05$ em comparação à T0.

4.4 Biomarcadores de estresse oxidativo

A determinação do estado de estresse oxidativo foi definida através de técnicas de citometria de fluxo por meio da análise de fluorescência de DHE, DCF, HPF e DAF. A Figura 10 demonstra a produção de ROS sistêmica medida antes e após o tratamento com kefir. Observa-se uma redução significativa nos níveis séricos de $\cdot\text{O}_2^-$, H_2O_2 e $\text{ONOO}^- / \text{OH}^-$ (Figura 12 (a)) com um aumento simultâneo nos níveis de NO (Figura 12 (b)). O gráfico de barras na Figura 12 (c) representa os valores médios de $\cdot\text{O}_2^-$ (T0: 5953 ± 999 vs. T90: 3622 ± 707 , a.u.), H_2O_2 (T0: 4580 ± 611 vs. T90: 3202 ± 286 , a.u.), $\text{ONOO}^- / \text{OH}^-$ (T0: 1161 ± 70 vs. T90: 874 ± 34 , a.u.), and NO (T0: 3493 ± 304 vs. T90: 1799 ± 158) entre T0 e T90.

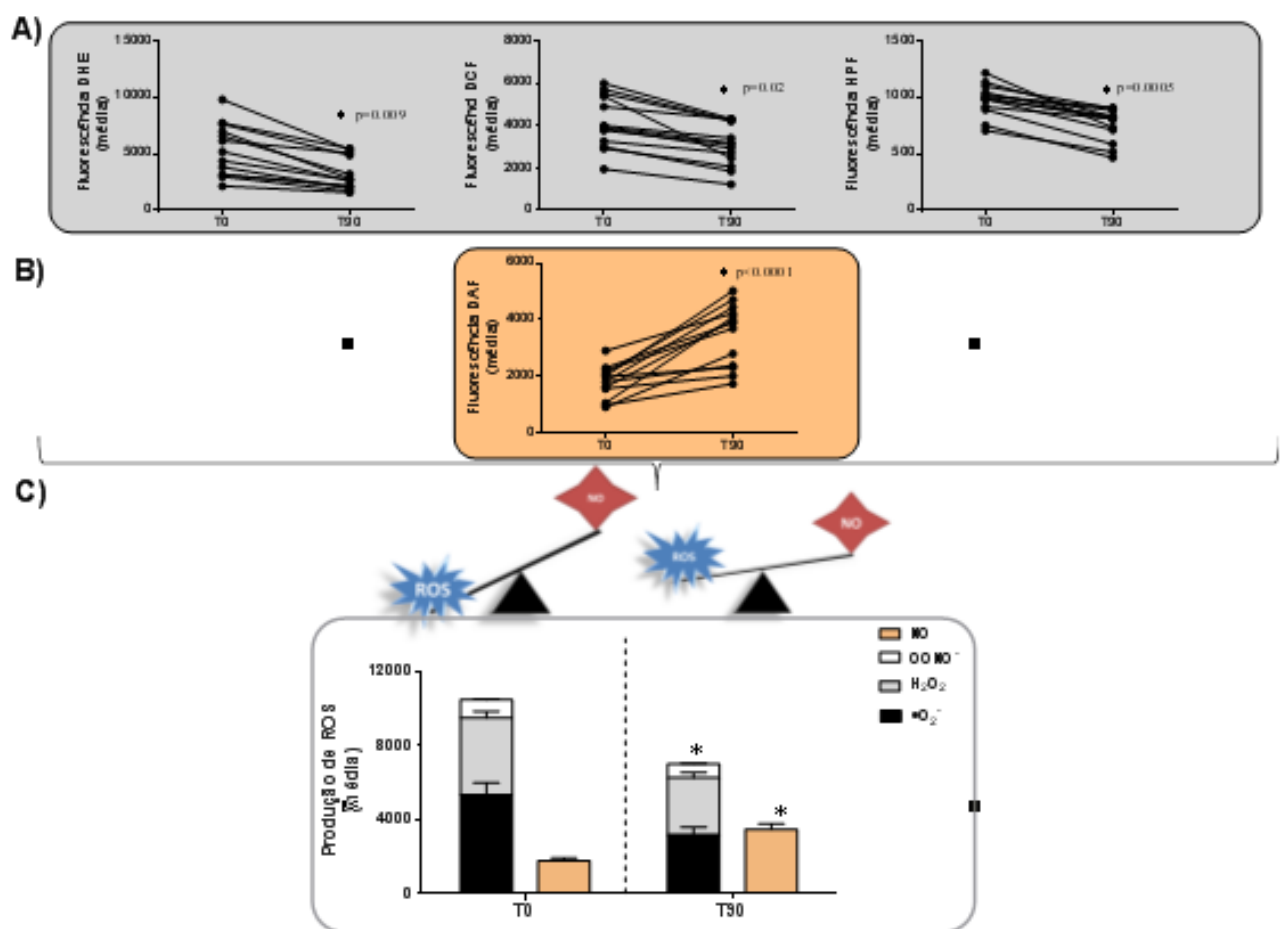


Figura 12: Níveis de ânion superóxido, peroxide de hidrogênio, peroxinitrito/radical hidroxila e óxido nítrico (DHE, DCF, HPF e DAF, respectivamente). Os valores da produção de ROS foram definidos antes e após 90 dias da suplementação simbiótica. Nota-se uma marcada recuperação do balanço de ROS após o tratamento. Os resultados foram expressados em média $\pm$ SEM ($n = 13$). $*p < 0.05$ em comparação a T0.

4.5. Ensaio de apoptose

A citometria de fluxo foi utilizada, também, para determinar o efeito antiapoptótico do kefir através da quantificação de células positivas para a anexina V. A fosfatidilserina (PS) é externalizada e disponível para detecção pela anexina V quando as células sofrem apoptose. Após o tratamento com kefir, a porcentagem de células positivas para a anexina V diminuiu em T90 ($6,86 \pm 1,91\%$) em comparação com T0 ($12,88 \pm 1,91\%$) (Figura 13). Consequentemente, a maioria das células era negativa para a anexina V, indicando o impacto protetor do kefir sobre a viabilidade celular.

A proporção de células viáveis/apoptóticas (relação V / A) foi de 2,05, e a relação V/A média aumentou de 6,53 no T0 para 13,39 no T90.

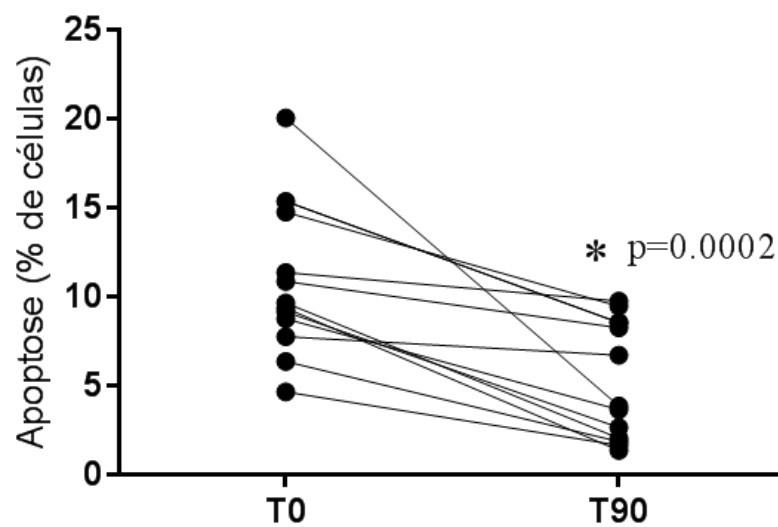


Figura 13: Marcada redução no índice de apoptose celular, demonstrado pelo teste da Anexina V. O resultado foi expresso em média $\pm$ SEM ($n = 13$). $*p = 0.0002$ em comparação à T0.

5. DISCUSSÃO

Em 1908, um zoólogo russo chamado Metchnikoff popularizou pela primeira vez o consumo de probióticos na forma de iogurte como um "alimento saudável" (Metchnikoff, 1908; Tauber, 2003; Morris, 2018). No entanto, apenas 100 anos depois, foi reconhecido que os probióticos podem influenciar a função do sistema nervoso central por meio da modulação do eixo microbiota-intestino-cérebro (Akbari et al., 2016; Sampson & Mazmanian, 2015). No entanto, investigações clínicas analisando o uso de probióticos em pacientes idosos com demência ainda são escassas na literatura médica (Kowalski & Mulak, 2019). Apesar da susceptibilidade de pacientes com DA à múltiplas complicações relacionadas ao desempenho cognitivo, as estratégias terapêuticas eficazes na redução da velocidade de progressão da doença ainda são escassas.

Os resultados obtidos com a suplementação de leite fermentado por kefir durante o período de 90 dias demonstraram uma significativa melhora em todos os testes cognitivos aplicados avaliando diferentes domínios cognitivos (memória, função visual-espacial e habilidades de abstração, funções executivas e de linguagem, habilidades construtivas e função atenciosa), corroborando os resultados descritos por Akbari e colaboradores (2016) que também observaram que o uso de probiótico (contendo *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium bifidum* e *Lactobacillus fermentum*) por 12 semanas foi capaz de melhorar a função cognitiva. Mais recentemente, Kobayashi e colaboradores (2019) relataram que a suplementação oral durante 24 semanas com *Bifidobacterium breve* A1 melhorou a função cognitiva em pacientes com DA.

Sugere-se que a suplementação com kefir também é capaz de alterar a microbiota intestinal, contribuindo com o processo de neuromodulação mediada pela síntese neuroativa e neuroendócrina (envolvendo, por exemplo, acetilcolina, dopamina, serotonina, noradrenalina, adrenalina, glutamato, ácido gama-aminobutírico e fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF)) e pela expressão central de seus receptores (Kowalski & Mulak, 2019; Akbari et al., 2016; Cryan & Dinan, 2012; Hemarajata & Versalovic, 2012; Agustí et al., 2018; Martin et al., 2018; Baj et al., 2019). Tal hipótese baseia-se, parcialmente, em descobertas recentes relacionadas à análise microbiótica de pacientes com DA submetidos à suplementação probiótica com importante modificação da composição intestinal e alteração dos níveis séricos de triptofano, um precursor de aminoácidos na

biossíntese de serotonina e melatonina (Leblhuber et al., 2018). Além disso, evidências experimentais apoiam essa ideia, demonstrando um nível reduzido de receptores séricos de serotonina, BDNF e NMDA em camundongos livres de germes em comparação com camundongos convencionais (Sudo et al., 2004; Wikoff et al., 2009) e sugerindo que a suplementação probiótica com *Lactobacilli* pode aumentar a disponibilidade de GABA a partir do glutamato (Higuchi et al., 1997)

Mais recentemente, outros estudos com modelos animais demonstraram que a microbiota intestinal é um potente influenciador do BDNF nas áreas corticais e do hipocampo, além de ser capaz de aumentar o *turnover* estriatal de monoamina e modular a expressão do receptor de serotonina 1A (Martin et al., 2018; Neufeld et al., 2011). Acredita-se, portanto, que a influência da modulação microbiótica na definição do estado inflamatório e no estresse oxidativo pode apresentar efeito neuroprotetor.

Adicionalmente, sabe-se que o processo de neuroinflamação representa um papel relevante na patogênese da DA evidenciando por diversos estudos clínicos e experimentais (Jayasena et al., 2015; Bostancıkloğlu, 2019; Doecker et al., 2012; Baylis et al., 2013; Buroff et al., 2017; Alasmari et al., 2018; Franceschi et al., 2018). Diversos autores demonstram associações positivas entre as citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, IL-1, IL-6, TNF- α , IL-8 e IL-12) e a progressão da DA (Alasmari et al., 2018; Zheng et al., 2016).

Além disso, investigações recentes relataram que essas citocinas neuroinflamatórias podem comprometer a depuração de A β , levando ao acúmulo dessa proteína no cérebro (Zuroff et al., 2017; Alasmari et al., 2018; Patel et al., 2005; Leung et al., 2013; Kinney et al., 2018). Desta forma, o balanço entre as citocinas tem sido um importante alvo de pesquisa com o objetivo de compreender a fisiopatologia da DA e identificar novos alvos terapêuticos em potencial. Ao mesmo tempo, dados emergentes demonstraram que uso de probióticos pode contribuir com a modulação de agentes com propriedades imunomodulatórias (Pereira et al., 2016; Martin et al., 2018; Zarrati et al., 2014). Além disso, estudos relevantes demonstraram uma redução nos índices das citocinas pró-inflamatórias após a suplementação probiótica em diferentes grupos clínicos (Musa et al., 2017; Sanaie et al., 2014; Angurana et al., 2018).

Outrossim, a análise dos níveis de biomarcadores séricos de estresse oxidativo pode ser uma abordagem interessante em indivíduos com doenças neurodegenerativas (Migliore et al., 2005; Gibson & Huand, 2005; Marcoraukis et al., 2018; Chang et al., 2014; Peña-Bautista et al., 2019) no sentido de avaliar o impacto

de novas estratégias terapêuticas em pacientes com DA. Existe uma forte correlação entre a adoção de dietas ricas em antioxidantes como uma estratégia neuroprotetora simples (Naoi et al., 2019; Williams et al., 2019; Oliver & Reddy, 2019) incluindo o uso de probióticos (Musa et al., 2017; Akbari et al., 2016).

Neste estudo, comprovou-se, por meio da avaliação do estresse oxidativo, que o kefir apresenta efeitos antioxidantes significativos com impacto favorável na melhoria cognitiva em pacientes com DA. Sabe-se que índices excessivos de ROS estão envolvidos como causa e consequência do estado pró-inflamação, contribuindo direta e indiretamente para a patogênese da DA (Oliver & Reddy, 2019; Benzi & Moretti, 1995; Praticò, 2008; Su & Wand, 2008; Shefa et al., 2019). Mais especificamente, devido à sua eletronegatividade e reatividade, $\bullet\text{O}_2^-$, H_2O_2 e $\text{ONOO}^-/\bullet\text{OH}^-$ podem oxidar lipídios, ácidos nucleicos e proteínas levando à destruição mitocondrial, neuroexcitotoxicidade (influxo excessivo de Ca^{2+} e formação de agregados de substâncias tóxicas e proteínas) e estimulação astrocitária no desenvolvimento da resposta inflamatória (Pereira et al., 2016; Porto et al., 2015; Sochocka et al., 2017). Por outro lado, o NO (pelas isoformas eNOS ou nNOS) apresenta importantes propriedades neuroprotetoras como antioxidante (atuando como eliminador de $\bullet\text{O}_2^-$), vasodilatador (aumento do suprimento sanguíneo cerebral para neurônios), inibidor de receptores NMDA nas sinapses glutamatérgicas (impedindo a neuroexcitotoxicidade) e evitando a deposição de A β (Balez & Ooi, 2016; Manukhina et al., 2008; Paul & Ekambaram, 2011; Yuan et al., 2019).

Este estudo demonstra que a suplementação com kefir foi capaz de reduzir a biodisponibilidade sérica de ROS e aumentar o nível de NO, levando à atenuação da oxidação das proteínas plasmáticas em pacientes com DA (Figura 14). Esses dados podem ser apoiados por experimentos de Musa e colaboradores (2017) que revelaram um aumento na atividade de enzimas antioxidantes (SOD, GSH e GPx) no tecido cerebral de camundongos tratados com *Lactobacillus*.

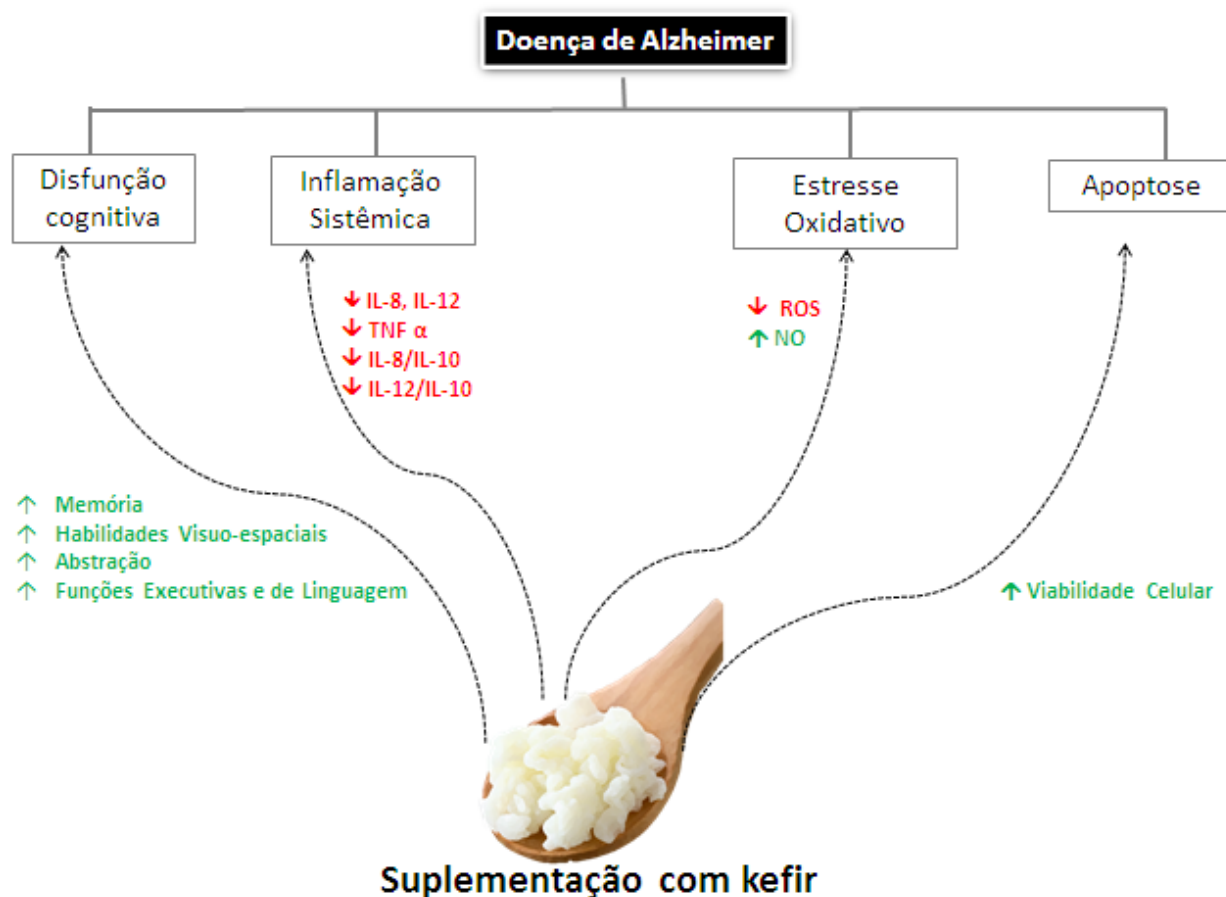


Figura 14: Esquema simplificado demonstrando os principais efeitos após 90 dias de suplementação com kefir em pacientes com doença de Alzheimer.

Este estudo teve algumas limitações metodológicas potenciais. Primeiro, devido às dificuldades em obter amostras fecais frescas, tivemos problemas com a análise da microbiota fecal antes e após a suplementação de kefir em nossos pacientes com DA. Segundo, nosso estudo foi realizado sem os participantes do controle usando outro tipo de leite fermentado. Terceiro, o tamanho da amostra era pequeno, mas justificado pela idade dos pacientes, e era acompanhado por critérios de exclusão severos. Quarto, a análise cognitiva foi realizada pela própria autora. Além disso, o impacto do viés do efeito de aprendizagem foi minimizado por meio de procedimentos aleatórios aplicados nos testes cognitivos no presente estudo. Por fim, mas não menos importante, poderíamos ter enriquecido os dados que exploram biomarcadores de imagem (por exemplo, ressonância magnética e PET) ou biomarcadores específicos (por exemplo, fator neurotrófico derivado do cérebro, butirilcolinesterase neuronal e apolipoproteína A1) que estenderiam os possíveis efeitos benéficos induzida pela administração crônica de kefir nesses pacientes com

DA. Apesar dessas limitações, a novidade de nosso estudo é demonstrar os efeitos benéficos da suplementação crônica de kefir sobre a função cognitiva em idosos com DA.

Na presente tese de doutorado, contemplada com o suporte financeiro do Apoio a Grupos de Excelência (PRONEx, Termo de Outorga 569/2018) através do Edital 24/2018 da Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (Fapes) e Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia (CNPq), objetivamos aplicar ferramentas para testar as hipóteses levantadas durante o desenho do projeto, com o foco na análise da interação entre a microbiota intestinal e o desenvolvimento de doenças crônicas complexas.

Justifica-se a investigação pela constatação de que os mecanismos através dos quais o estado de demência clínica que acomete os indivíduos portadores da doença de Alzheimer ainda não estão bem definidos. Além disto, os altos índices de prevalência da patologia secundários ao aumento da sobrevida individual global, os processos de degeneração associados à longevidade e a vasta lacuna na definição terapêutica dessa doença evidenciada pela escassez de instrumentos farmacológicos aprovados e aplicáveis clinicamente que tornam imperativa a necessidade de aplicar esforços no desenvolvimento de ferramentas eficazes na prevenção e no tratamento da DA.

Os dados foram coletados de uma amostra de conveniência, inicialmente composta de 34 pacientes previamente diagnosticados com demência clínica, caracterizada pela deterioração cognitiva progressiva em dois domínios com impacto funcional, submetidos à suplementação simbiótica com leite fermentado com kefir por 90 dias consecutivos. A média etária dos sujeitos elencados é de 80 anos com maioria feminina, conforme tendência mundial relacionada à própria doença.

6. CONCLUSÃO

No presente estudo, observou-se que a suplementação alimentar com o simbiótico kefir por 90 dias consecutivos foi capaz de trazer melhorias substanciais (28%) na função cognitiva global detectada através da aplicação do mini-exame do estado mental. Na análise das funções de memória imediata e tardia após a suplementação com leite fermentado com kefir, observou-se expressiva recuperação cognitiva, conforme os dados apresentados, com melhora em aproximadamente 60% do desempenho apresentado em relação ao momento zero. De modo similar, observou-se uma melhora significativa nas funções envolvendo as habilidades construtivas.

Conforme observa-se no artigo resultante desta pesquisa, publicado na *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* com honrosa menção de leitura por parte da revista *Nature*, os resultados obtidos são amplamente impactantes no meio científico. No que tange à avaliação citométrica, observa-se que os indivíduos demonstraram, antes da suplementação, altos níveis de inflamação revelados por meio da quantificação de citocinas inflamatórias e marcado estado de estresse oxidativo, conforme demonstrado pela dosagem das ROS. Constatou-se, todavia, que a intervenção clínica proposta foi capaz de reduzir, significativamente, tais indicadores com consequente aumento da viabilidade celular com redução do índice de apoptose celular.

Conclui-se, portanto, que o desequilíbrio na liberação/neutralização de ROS, a hiperatividade imune e o processo inflamatório sistêmico são importantes biomarcadores da deterioração neurológica na DA. Ademais, o uso do leite fermentado com kefir apresenta importante ação benéfica nestes doentes, por suas propriedades anti-oxidativas e anti-inflamatórias.

Tais achados levantam novos caminhos a serem percorridos em estudos subsequentes e ensaios clínicos mais abrangentes que possam contar, inclusive, com um grupo controle. O impacto do sucesso desta e outras pesquisas similares dar-se-á não apenas no campo científico, mas, também, como uma significativa mudança social, no que tange às mudanças estruturais familiares em resposta à dramaticidade do quadro clínico do doente com DA e seu nível de dependência funcional, e em âmbito de saúde pública, na medida em que levaria à redução de custos com

institucionalização e hospitalização e na mitigação do prejuízo da capacidade laborativa por parte do cuidador responsável.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores revelam não haver conflitos de interesses.

7. REFERÊNCIAS

ALAM, A.; HANA, Z.; JIN, Z.; SUEN, K. C.; MA, D. Surgery, neuroinflammation and cognitive impairment. *EBio Medicine*, v. 37, p. 547-56, 2018.

ALASMARI, F.; ALSHAMMARI M. A.; ASLAMARI, A. F. et al. Neuroinflammatory cytokines induce amyloid beta neurotoxicity through modulating amyloid precursor protein levels/metabolism. *BioMed Research International*, doi: 10.1155/2018/30874, 2018.

ALZHEIMER'S ASSOCIATION 2019. Alzheimer's Disease Facts and Figures. *Alzheimers Dement*, v. 15, n. 3, p. 32-49, 2019.

ALZHEIMER, A. Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren alters. *Zeitschrift für die Gesamte Neurologie und Psychiatrie*, v. 4, p. 356-85, 1911.

AKBARI, E.; ASEMI, Z.; DANESHVAR R. et al. Effect of probiotic supplementation on cognitive function and metabolic status in Alzheimer's disease: a randomized, double-blind and controlled trial. *Frontiers in Aging Neuroscienc*, v. 8, n. 256, 2016.

ANO, I.; IKADO, K.; UCHID, K.; NAKAYAMA, H.; Amyloid b-induced mesenteric inflammation in an Alzheimer's disease transgenic mouse model. *Curr Alzheimer Res*, v. 17, n. 1, p. 52-59, 2020.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. *American Psychiatric Association*. ed. 1, 1968.

AMORIM, F. G.; COITINHO, L. B.; DIAS, A. T. et al. Identification of new bioactive peptides from Kefir milk through proteopeptidomics: bioprospection of antihypertensive molecules. *Food Chemistr*, v. 282, p. 109-119, 2019.

ANNWEILER, C.; ROLLAND, Y.; SCHOTT, A. M. et al. Higher vitamin D dietary Intake is associated with lower risk of alzheimer's disease: a 7-year follow-up. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, v. 67, n. 11, p. 1205-11, 2012.

AUGUSTÍ, A.; GARCÍA-PARDO, M. P.; LÓPEZ-ALMELA, I. et al. Interplay between

the gut-brain axis, obesity and cognitive function. *Frontiers in Neuroscience*, v. 12, n. 55, 2018.

ASSAL, F. History of dementia. *Front Neurol Neurosci*, v. 44, p. 118-26, 2019.

BAJ, A. MORO, E.; BISTOLETTI, M. et al. Glutamatergic signaling along the microbiota-gut-brain axis. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 6, . 2019.

BALEZ, R.; OOI, L. Getting to NO Alzheimer's disease: neuroprotection versus neurotoxicity mediated by nitric oxide. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. doi: 10.1155/2016/380615 , 2016.

BALLIN, B. J.; HUDSON, A. P. Etiology and pathogenesis of late-onset Alzheimer's disease. 2. *Current Allergy and Asthma Reports*, v. 14, n. 3, 2014.

BARBOZA, K. M. R.; COCO, L. Z.; ALVES, G. M. et al. Gastroprotective effect of oral kefir on indomethacin-induced acute gastric lesions in mice: impact on oxidative stress. *Life Sciences*, v. 209, p. 370-76, 2018.

BARNETT, R. Alzheimer's disease. *Lancet*, V. 393, 2019.

BASTIN, C.; DELHAYE, E.; MOULIN, C.; BARBEAU, E. J. Novelty processing and memory impairment in Alzheimer's disease: a review. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 100, p.237-249, 2019.

BAYLIS, D.; BARLETT, D.; PATEL, H. P. et al. Understanding how we age: insights into inflammaging. *Longevity & Healthspan*, v. 2, n. 1, 2013.

BENZI, G.; MORETTI, A. Are reactive oxygen species involved in Alzheimer's disease? *Neurobiology of Aging*, v. 16, n. 4, 1995.

BOWMAN, D. G. L.; DAYON, L.; KIRKLAND, R. et al. Blood-brain barrier breakdown, neuroinflammation, and cognitive decline in older adults. *Alzheimers Dement*, v. 14, n. 12, 2018.

BONDI, M. W.; EDMONS, E. C.; SALMON, D. P. Alzheimer's disease: past, present, and future. *J Int Neuropsychol Soc*, v. 23, p. 818-31, 2017.

BRAYNE, C.; MILLER, B. Dementia and aging populations: a global priority for contextualized research and health policy. *PLOS Medicine*. V. 14, n. 3, 2017.

CAMPAGNARO, B. P.; TONINI, C. L.; NOGUEIRA, B. V. et al. DNA damage and augmented oxidative stress in bone marrow mononuclear cells from angiotensin-dependent hypertensive mice. *International Journal of Hypertension*, 2013.

CHANG, Y. T.; CHANG, W. N.; TSAI, N. W. et al. The roles of biomarkers of oxidative stress and antioxidant in Alzheimer's disease: a systematic review. *BioMed Research International*, doi: 10.1155/2014/182303, 2014.

CHEN, Z.; ZHONG, C. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurosci Bull*, v. 30, n. 2, 2014.

CRYAN, J. F.; DINAN, T. G. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behavior. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 13, n. 10, 2012.

COMMENGES, D.; SCOTET, V.; RENAUD, S. et al. Intake of flavonoids and risk of dementia. *Eur J Epidemiol*, v. 16, n. 4, p. 357-63, 2000.

COOPER, H. A.; SCALIA, R.; RIZZO, V.; EGUCHI, S. Angiotensin II- and Alzheimer-type cardiovascular aging. *Circ Res*, v. 123, n. 6, p. 651-53, 2018.

CUMMINGS, G.; LEE, G.; RITTER A. Alzheimer's disease drug development pipeline: 2019. *Alzheimers Dement (NY)*, v. 9, n. 5, p. 272-93, 2019.

DOECKE, J. D.; LAWS, S. M.; FAUX, N. G. et al. Blood-based protein biomarkers for diagnosis of Alzheimer disease. *Archives of Neurology*, v. 69, n. 10, 2012.

DOODY, R. Developing disease-modifying treatments in Alzheimer's disease: a perspective from Roche and Genentech. *J Prev Alzheimers Dis*, v. 4, n. 4, p. 264-72, 2017.

DOMINGUEZ, L.J.; BARBAGALLO, M. Nutritional prevention of cognitive decline and dementia. *Acta Biomed*, v. 89,n.2, p. 276-90, 2018.

DUONG, S.; PATEL, T.; CHANG, F. Dementia: what pharmacists need to know. *Canadian Pharmacists Journal*, v. 150, n. 2, 2017.

FRIQUES, A. G. F.; ARPINI, C. M.; KALIL, I. C. et al. Chronic administration of the

probiotic kefir improves the endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Translational Medicine*, v. 13, n. 1, 2015.

GBD 2016 DEMENTIA COLLABORATORS. Global, regional, and national burden of Alzheimer's disease and other dementias, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurology*, v. 18, n. 1, 2019.

LIU, Z.; LI T.; LI, P. et al. The ambiguous relationship of oxidative stress, tau hyperphosphorylation, and autophagy dysfunction in Alzheimer's disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, doi: 10.1155/2015/352723, 2015.

GIBSON, G. E.; HUANG, H. M. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, v. 25, n. 5, 2005.

HARMAN, D. The aging process. *Proc Natl Acad Sci*, v. 78, n. 11, 1981.

HEMARAJATA, P; VERSALOVIC, J. Effects of probiotics on gut microbiota: Mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, v. 6, n. 1, 2012.

HIGUCHI, H.; HAYASHI, H.; ABE, K. Exchange of glutamate and gamma-aminobutyrate in a *Lactobacillus* strain. *Journal of Bacteriology*, v. 179, n. 10, 1997.

JHANG, K. A.; PARK, J. S.; KIM, H. S. et al. Resveratrol ameliorates tau hyperphosphorylation at Ser396 site and oxidative damage in rat hippocampal slices exposed to vanadate: implication of ERK1/2 and GSK-3 β signaling cascades. *J Agric Food Chem*, v. 65, n. 44, p. 9626-34, 2017.

JORDA, A.; CAMPOS-CAMPOS, J.; IRADI, A. et al. The role of chemokines in Alzheimer's disease. *Endocr Metabol Immune Disord Drug Targets*, doi: 10.2174/1871530320666200131110744, 2020.

KAMAT, P. K.; KALANI, A.; RAJ, S. et al. Mechanism of oxidative stress and synapse dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer's disease: understanding the therapeutics strategies. *Mol Neurobiol*, v. 53, n. 1, 2016.

KEHOE, P. G. The coming of age of the angiotensin hypothesis in Alzheimer's

disease: progress toward disease prevention and treatment? *J Alzheimers Dis*, v. 62, n. 3, 2018.

KNOPMAN, D. S.; DEKOSKY, S. T.; CUMMINGS, J. L. et al. Practice parameter: diagnosis of dementia (an evidence-based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*, V. 56, N. 9, 2001.

KOBAYASHI, Y.; KINOSHITA, T.; MATSUMOMO, A. et al. *Bifidobacterium breve* A1 supplementation improved cognitive decline in older adults with mild cognitive impairment: an open-label, single-arm study. *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease*, v. 6, n.1, 2019.

KOWALSKI, K.; MULAK, A. Brain-gut-microbiota axis in Alzheimer's disease. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, v. 25, n.1, 2019.

KINNEY, J. W.; BEMILLER, S. M.; MUURTISHAW, S. A. et al. Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, v. 6., n. 4, p. 575-590, 2018.

KLIPPEL, B. F.; DUEMKE, L. B.; LEA, A. B. et al. Effects of kefir on the cardiac autonomic tones and baroreflex sensitivity in spontaneously hypertensive rats. *Frontiers in Physiology*, v. 7, n. 211, 2016.

KNOPMAN, S. D.; PETERSEN, R. C.; JACK JR, C. R. A brief history of Alzheimer's disease: multiple meaning separated by a common name. *Neurology*, v. 99, n. 22, 2019.

LEBLHUBER, F.; STEINER, K.; SCHUETZ, B. et al. Probiotic supplementation in patients with Alzheimer's dementia: an explorative intervention study. *Current Alzheimer Research*, v. 15, n. 12, 2018.

LEITE, A. M. O.; MIGUEL, M. A. L.; PEIXOTO, R. S. et al. Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 44, n. 2, 2013.

LEUNG, R.; PROITSI, P.; SIMMONS, A. et al. Inflammatory proteins in plasma are

associated with severity of Alzheimer's disease. *PLoS One*, v. 8, n. 6, 2013.

LIU, Z.; LI, T.; LI, P. et al. The ambiguous relationship of oxidative stress, tau hyperphosphorylation, and autophagy dysfunction in Alzheimer's disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, doi: 10.1155/2015/352723, 2015.

MARTINS, R. N.; VILLEMAGNE, V.; SOHRABI, H. R.; et al. Alzheimer's disease: a journey from amyloid peptides and oxidative stress, to biomarker technologies and disease prevention strategies-gains from AIBL and DIAN cohort studies. *J Alzheimers Dis*, v. 62, n. 3, p. 965–992, 2018.

MANUKHINA, E. B.; PSHENNIKOVA, M. G.; GORYACHEVA, A. V. et al. Role of nitric oxide in prevention of cognitive disorders in neurodegenerative brain injuries in rats. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, v. 146, n. 4, 2008.

MANZINE, P. R.; VATANABE, I. P.; PERON, R. et al. Blood-based biomarkers of Alzheimer's disease: the longing and winding road. *Curr Pharm Des*, doi: 10.2174/1381612826666200114105515, 2020.

MARCOURAKIS, T.; CAMARINI, R.; KAWAMOTO, E. M. Peripheral biomarkers of oxidative stress in aging and Alzheimer's disease. *Dementia & Neuropsychologia*, v. 2, n.1, 2008.

MARFANY, A.; SIERRA, C.; CAMAFORT, M.; DOMÉNECH, M.; COCA, A. High blood pressure, Alzheimer disease and antihypertensive treatment. *Panminerva Med*, v. 60, n. 1, 2018.

MARTIN, C. R.; OSADCHIY, V.; KALANI, A. et al. The brain-gut-microbiome axis. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, v. 6, n. 2, 2018.

MASAKI, K. H.; LOSONCZY, K. G.; IZMIRLIAN, G. et al. Association of vitamin E and C supplement use with cognitive function and dementia in elderly men. *Neurology*, v. 54, n. 1265-72, 2002.

MAURER, K.; MAURER, U. Alzheimer: the life of a physician and career of a disease. *New York: Columbia University Press*, 2003.

MCKHANN, G. M.; DRACHMAN, D.; FOLSTEIN, M. et al. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices

of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*, v. 34, n. 7, 1984.

MEYRELLES, S. S.; PEOTTA, V. A.; PEREIRA, T. M. VASQUEZ, E. C. Endothelial dysfunction in the apolipoprotein E-deficient mouse: insights into the influence of diet, gender and aging. *Lipids Health Dis*, v. 10, n. 211, 2011.

MIGLIORE, L.; FONTANA, I.; TRIPPI F. et al. Oxidative DNA damage in peripheral leukocytes of mild cognitive impairment and AD patients. *Neurobiology of Aging*, v. 26, n. 5, 2005.

MISHRA, V.; MOKASHE, N. U.; CHAVAM, R. S. et al. Probiotics as potential antioxidants: A systematic review. *J. Agric. Food Chem*, v. 64, n. 14, 2015.

MORRIS, J. A. Optimise the microbial flora with milk and yoghurt to prevent disease. *Medical Hypotheses*, v. 114, p. 13-17, 2018

MUSA, N. H.; MANI, V.; LIM, S. M. et al. Lactobacilli-fermented cow's milk attenuated lipopolysaccharide-induced neuroinflammation and memory impairment in vitro and in vivo. *Journal of Dairy Research*, v. 84, n. 4, 2017.

NAOI, M.; WU, Y.; SHAMOTO-NAGAI, M. et al. Mitochondria in neuroprotection by phytochemicals: bioactive polyphenols modulate mitochondrial apoptosis system, function and structure. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 2, n. 10, 2019.

NEUFEL, K. M.; KANG, N.; BIENENSTOCK J. et al. Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice. *Neurogastroenterology & Motility*, v. 23, n. 3, 2011.

NIMGAMPALLE, M.; KUNA, Y. Anti-Alzheimer Properties of Probiotic, *Lactobacillus plantarum* MTCC 1325 in Alzheimer's Disease induced Albino Rats. *J Clin Diagn Res*, v. 11, n. 8, 2017.

NITRINI, R.; CARAMELLI, P.; BOTTINO, C. M. et al. Diagnóstico de doença de Alzheimer no Brasil: critérios diagnósticos e exames complementares. recomendações do departamento científico de neurologia cognitiva e do envelhecimento da Academia Brasileira de Neurologia. *Arquivos de Neuro-*

Psiquiatria, v. 63, n. 3, 2005.

OLIVER, D. M. A.; REDDY, P. H. Small molecules as therapeutic drugs for Alzheimer's disease. *Molecular and Cellular Neuroscience*, v. 96, p. 47-62, 2019.

OZAWA, M.; SHIPLEY, M.; KIVIMAKI, M.; SINGH-MANOUX, A.; BRUNNER, E.J. Dietary pattern, inflammation and cognitive decline: The Whitehall II prospective cohort study. *Clin Nut*, v. 36, n. 2, p/ 506-512, 2016.

PATEL, N. S.; PARIS, D.; MATHURA, V. Inflammatory cytokine levels correlate with amyloid load in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation*, v. 2, n.1, 2005.

PAUL, V.; EKAMBARAM, P. Involvement of nitric oxide in learning & memory processes. *The Indian Journal of Medical Research*, v. 133, n. 5, 2011.

PEÑA-BATISTA, C.; BAQUERO, M.; VENTO, M. et al. Free radicals in Alzheimer's disease: lipid peroxidation biomarkers. *Clinica Chimica Acta*, v. 491, p. 85-90, 2019.

PEREIRA, T. M. C.; PIMENTA, F. S.; PORTO, M. et al. Coadjuvants in the diabetic complications: nutraceuticals and drugs with pleiotropic effects. *International Journal of Molecular Sciences*, v, 17, n. 8, 2016.

PEREZ-MARTINEZ, G.; BAUERL, C.; COLLADO, M. C. Understanding gut Microbiota in elderly's health will enable intervention through probiotics. *Benef Microbes*, v. 5, n. 3, 2014.

PHILLIPS, M. A.; CHILDS, C. E.; CALDER, P. C. et al. No effect of omega-3 fatty acid supplementation on cognition and mood in individuals with cognitive Impairment and probable Alzheimer's Disease: A randomised controlled trial. *Int J Mol Sci*, v. 16, n. 10, 2015.

PIMENTA, F. S.; LUACES-REQUEIRA, M.; TON, A. M. M. et al. Mechanisms of action of kefir in chronic cardiovascular and metabolic diseases. *Cellular Physiology and Biochemistr*, v. 48, n. 5, 2018.

PORTO, M. L.; RODRIGUES, B. P.; MENEZES, TN. N. et al. Reactive oxygen species contribute to dysfunction of bone marrow hematopoietic stem cells in aged

C57BL/6 J mice. *Journal of Biomedical Science*, v. 2, n. 1, 2015.

PRATICÒ, D. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease: a reappraisal. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 29, n. 12, 2008.

ROSA, D. D.; DIAS, M. M. S.; GRZESKOWIAK, L. M. et al. Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefit. *Nutrition Research Reviews*, v. 30, n.1, 2017.

SAMPSON, T. R.; MAZMANIAN, K. Control of brain development, function, and behavior by the microbiome. *Cell Host & Microbe*, v. 17, n.5, 2015.

SANAIE, S.; EBRAHIMI-MAMEGHANI, M.; HAMISHEHKAR, H. et al. Effect of a multispecies probiotic on inflammatory markers in critically ill patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Journal of Research in Medical Sciences*, v. 19, n. 9, 2014.

SANTANNA, A. F.; FILETE, P. F.; LIMA, E. M. et al. Chronic administration of the soluble, nonbacterial fraction of kefir attenuates lipid deposition in LDLr^{-/-} mice. *Nutrition*, v. 35, p. 100-105, 2017.

SHARMA, P.; SHARMA, A.; FAYAZ, F. et al. Biological signatures of Alzheimer's disease. *Curr Top Med Chem*, doi: 10.2174/1568026620666200228095553, 2020.

SOCHOCKA, M.; DINIZ, B. S.; LESZEK, J. Inflammatory response in the CNS: friend or foe? *Molecular Neurobiolog*, v. 54, n. 10, 2017.

STELZMANN, R. A.; SCHNITZLEIN, N.; MURTAGH, F. R. An English translation of Alzheimer's paper, "über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". *Clinical Anatomy*, v. 8, n. 6, p. 429-31, 1995.

SU, B.; WANG, X.; NUNOMURA, A. et al. Oxidative stress signaling in Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*, v. 5, n. 6, 2008.

SUDO, N.; CHIDA, Y.; AIBA, Y. et al. Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic–pituitary–adrenal system for stress response in mice. *The Journal of Physiology*, v. 558, n. 1, 2004.

TAUBER, A. I. Metchnikoff and the phagocytosis theory. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 4, n. 11, 2003.

TON, A. M. M.; ARPINI, C. M.; CAMPAGNARO, B. P. et al. Alzheimer's disease: a brief update on the influence of gut microbiota and the impact of functional food. *J Food Microbiol*, v. 2, n. 1, 2018.

TONNIES, E.; TRUSHINA, E. Oxidative stress, synaptic dysfunction, and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, v. 57, n. 4, p. 1105-1121, 2017.

VALENTINI, L.; PINTO, A.; BOURDEL- MARCHASSON, I. et al. Impact of personalized diet and probiotic supplementation on inflammation, nutritional parameters and intestinal microbiota and the "RISTOMED project": randomized controlled trial in healthy older People. *Clinical Nutrition*, v. 34, n. 4, 2013.

VASQUEZ, E. C.; PEREIRA, T. M. C.; PEOTTA, V. A. et al. Probiotics as beneficial dietary supplements to prevent and treat cardiovascular diseases: uncovering their impact on oxidative stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, doi: 10.1155/2019/3086270, 2019.

VASQUEZ, E. C.; AIRES, R.; TON, A. M. M.; AMORIM, F. G. New insights on the beneficial effects of the probiotic kefir on vascular dysfunction in cardiovascular and neurodegenerative diseases. *Current Pharmaceutical Design*, doi: 10.2174/1381612826666200304145224, 2020.

VASQUEZ, E. C.; PEREIRA, T. M. C.; PEOTTA, V. A. et al. Probiotics as beneficial dietary supplements to prevent and treat cardiovascular diseases: Uncovering their impact on oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev*, doi: 10.1155/2019/3086270, 2019.

VASQUEZ, E. C.; GAVA, A. L.; GRACELI, J. B. et al. Novel therapeutic targets for phosphodiesterase 5 inhibitors: current state-of-the-art on systemic arterial hypertension and atherosclerosis. *Curr Pharm Biotechnol*, v. 17, n. 4, 2016.

VASQUEZ, E. C.; PEOTTA, V. A.; MEYRELLES, S. S. Cardiovascular autonomic imbalance and baroreflex dysfunction in the apolipoprotein E-deficient mouse. *Cell Physiol Biochem*, v. 29, p. 635-46, 2012.

VASQUEZ, E. C.; PEOTTA, V. A.; GAVA, A. L. et al. Cardiac and vascular phenotypes in the apolipoprotein E-deficient mouse. *J Biomed Sci*, v. 19, n. 1, 2012.

WIKOFF, W. R.; ANFORA, A. T.; LIU, A. Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 106, n. 10, 2009.

WILLIAMS, D. M.; HAGG, S.; PEDERSEN, N. L. Circulating antioxidants and Alzheimer disease prevention: a Mendelian randomization study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 109, n. 1, 2019.

YIANNOPOULOU, K. G.; PAPAGEORGIOU, S. G. Current and future treatments in Alzheimer disease: an update. *J Cent Nerv Syst Dis*, v.6, n. 1, n. 19-33, 2020.

YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev*, v. 74, n. 1, 1994.

YUAN, Y.; YANG, T.; CHEN, H et al. New insights into oxidative stress and inflammation during diabetes mellitus-accelerated atherosclerosis. *Redox Biology*, v. 20, p. 247-260, 2019.

ZARRATI, M.; SALEHI, E.; NOURIELYANI, K. et al Effects of probiotic yogurt on fat distribution and gene expression of proinflammatory factors in peripheral blood mononuclear cells in overweight and obese people with or without weight-loss diet. *Journal of the American College of Nutrition*, v. 33, n. 6, 2014.

SHANG, W. Y.; YAMAKAWA, Y.; MATSUYA, Y. et al. Synthesis of long-chain fatty acid derivatives as a novel anti-Alzheimer's agent. *Bioorg Med Chem Lett*, v. 24, n. 2, p. 604-8, 2014.

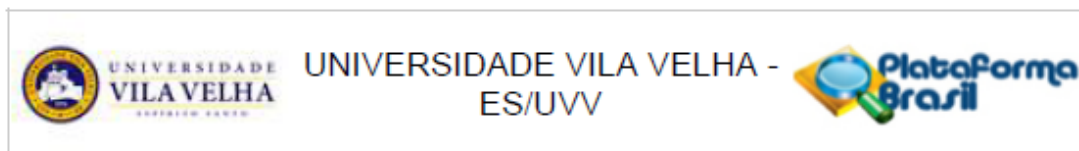
ZHENG, C.; ZHOU, X. W.; WANG, J. Z. The dual roles of cytokines in Alzheimer's disease: update on interleukins, TNF- α , TGF- β and IFN- γ . *Translational Neurodegeneration*, v. 5, n. 1, 2016.

ZIEFLER-GRAHAM, K. *Alzheimer's Dement*, v. 3, p. 168-69, 2007.

ZUROFF, L.; DALEY, D.; BLACK, K. L. et al. Clearance of cerebral A β in Alzheimer's disease: reassessing the role of microglia and monocytes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 74, n. 12, 2017.

8. ANEXOS

8.1. Anexo A - Parecer consubstanciado do CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estresse Oxidativo em Pacientes com Doenças Neurodegenerativas: Efeitos da Suplementação Probiótica

Pesquisador: Elisardo Corral Vasquez

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 60349516.0.0000.5064

Instituição Proponente: SOC EDUC DO ESP SANTO UNIDADE DE V VELHA ENSINO SUPERIO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.804.392

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

VILA VELHA, 03 de Novembro de 2016

8.2. Anexo B – Escala de depressão de Hamilton

1	0 Não me sinto triste 1 Eu me sinto triste 2 Estou sempre triste e não consigo sair disto 3 Estou tão triste ou infeliz que não consigo suportar	7	0 Não me sinto decepcionado comigo mesmo 1 Estou decepcionado comigo mesmo 2 Estou enojado de mim 3 Eu me odeio
2	0 Não estou especialmente desanimado quanto ao futuro 1 Eu me sinto desanimado quanto ao futuro 2 Acho que nada tenho a esperar 3 Acho o futuro sem esperanças e tenho a impressão de que as coisas não podem melhorar	8	0 Não me sinto de qualquer modo pior que os outros 1 Sou crítico em relação a mim por minhas fraquezas ou erros 2 Eu me culpo sempre por minhas falhas 3 Eu me culpo por tudo de mal que acontece
3	0 Não me sinto um fracasso 1 Acho que fracassei mais do que uma pessoa comum 2 Quando olho pra trás, na minha vida, tudo o que posso ver é um monte de fracassos 3 Acho que, como pessoa, sou um completo fracasso	9	0 Não tenho quaisquer idéias de me matar 1 Tenho idéias de me matar, mas não as executaria 2 Gostaria de me matar 3 Eu me mataria se tivesse oportunidade
4	0 Tenho tanto prazer em tudo como antes 1 Não sinto mais prazer nas coisas como antes 2 Não encontro um prazer real em mais nada 3 Estou insatisfeito ou aborrecido com tudo	10	0 Não choro mais que o habitual 1 Choro mais agora do que costumava 2 Agora, choro o tempo todo 3 Costumava ser capaz de chorar, mas agora não consigo, mesmo que o quera
5	0 Não me sinto especialmente culpado 1 Eu me sinto culpado grande parte do tempo 2 Eu me sinto culpado na maior parte do tempo 3 Eu me sinto sempre culpado	11	0 Não sou mais irritado agora do que já fui 1 Fico aborrecido ou irritado mais facilmente do que costumava 2 Agora, eu me sinto irritado o tempo todo 3 Não me irrito mais com coisas que costumavam me irritar

6	0 Não acho que esteja sendo punido 1 Acho que posso ser punido 2 Creio que vou ser punido 3 Acho que estou sendo punido	12	0 Não perdi o interesse pelas outras pessoas 1 Estou menos interessado pelas outras pessoas do que costumava estar 2 Perdi a maior parte do meu interesse pelas outras pessoas 3 Perdi todo o interesse pelas outras pessoas
13	0 Tomo decisões tão bem quanto antes 1 Adio as tomadas de decisões mais do que costumava 2 Tenho mais dificuldades de tomar decisões do que antes 3 Absolutamente não consigo mais tomar decisões	18	0 O meu apetite não está pior do que o habitual 1 Meu apetite não é tão bom como costumava ser 2 Meu apetite é muito pior agora 3 Absolutamente não tenho mais apetite
14	0 Não acho que de qualquer modo pareço pior do que antes 1 Estou preocupado em estar parecendo velho ou sem atrativo 2 Acho que há mudanças permanentes na minha aparência, que me fazem parecer sem atrativo 3 Acredito que pareço feio	19	0 Não tenho perdido muito peso se é que perdi algum recentemente 1 Perdi mais do que 2 quilos e meio 2 Perdi mais do que 5 quilos 3 Perdi mais do que 7 quilos Estou tentando perder peso de propósito, comendo menos: Sim _____ Não _____
15	0 Posso trabalhar tão bem quanto antes 1 É preciso algum esforço extra para fazer alguma coisa 2 Tenho que me esforçar muito para fazer alguma coisa 3 Não consigo mais fazer qualquer trabalho	20	0 Não estou mais preocupado com a minha saúde do que o habitual 1 Estou preocupado com problemas físicos, tais como dores, indisposição do estômago ou constipação 2 Estou muito preocupado com problemas físicos e é difícil pensar em outra coisa 3 Estou tão preocupado com meus problemas físicos que não consigo pensar em qualquer outra coisa
16	0 Consigo dormir tão bem como o habitual 1 Não durmo tão bem como costumava 2 Acordo 1 a 2 horas mais cedo do que habitualmente e acho difícil voltar a dormir	21	0 Não notei qualquer mudança recente no meu interesse por sexo 1 Estou menos interessado por sexo do que costumava 2 Estou muito menos interessado por sexo agora

	3 Acordo várias horas mais cedo do que costumava e não consigo voltar a dormir		3 Perdi completamente o interesse por sexo
17	0 Não fico mais cansado do que o habitual 1 Fico cansado mais facilmente do que costumava 2 Fico cansado em fazer qualquer coisa 3 Estou cansado demais para fazer qualquer coisa		