

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

FLÁVIO MOREIRA DE MORAIS

**DISFUNÇÃO NA ATIVIDADE DA CITOCROMO C OXIDASE (COX)
MITOCONDRIAL NA DOENÇA DE ALZHEIMER: REVISÃO SISTEMÁTICA E
METANÁLISE**

Belo Horizonte
2018

Flávio Moreira de Morais

**Disfunção na atividade da citocromo c oxidase (Cox) mitocondrial na
doença de Alzheimer:**
revisão sistemática e metanálise

Dissertação apresentada ao curso de pós-graduação em Neurociências da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Fabrício de Araújo Moreira

Co-orientadora: Mestre Pollyanna Vieira Gomes da Silva

Belo Horizonte

2018

043 Morais, Flávio Moreira de.
 Disfunção na atividade da citocromo c oxidase (Cox) mitocondrial na doença de Alzheimer: revisão sistemática e metanálise [manuscrito] / Flávio Moreira de Morais. – 2018.

56 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Fabrício de Araújo Moreira. Co-orientadora: Mestre Pollyanna Vieira Gomes da Silva.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Neurociências - Teses. 2. Doença de Alzheimer. 3. Mitocôndria. 4. Complexo IV da Cadeia de Transporte de Elétrons. 5. Metanálise. I. Moreira, Fabrício de Araújo. II. Silva, Pollyanna Vieira Gomes da. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612.8

Esta dissertação foi desenvolvida com o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, pela oportunidade de realizar o sonho de fazer o mestrado e de me conceder sempre muita perseverança para conquistar os meus objetivos.

À minha querida família, por sempre me apoiar e me incentivar em todos os momentos da minha vida.

Ao professor Fabrício de Araújo Moreira e Pollyanna Vieira Gomes da Silva (Polly), pela orientação, enorme apoio, carinho, amizade, que foram fundamentais para a conclusão deste trabalho.

À professora Angela pelo carinho e apoio de sempre na minha caminhada, sempre acreditando no meu potencial e sendo uma pessoa muito amiga e gentil.

Ao professor Antônio pela amizade e carinho.

Aos meus amigos e amigas da vida, do LNP e do LANECS, pela amizade, companheirismo, apoio, que foram muito importantes na minha caminhada.

Ao professor Raul, um grande professor e amigo que me inspirou a seguir a área da Neurociências e da carreira acadêmica.

A todos os professores que passaram pela minha vida que contribuíram para a minha formação através do conhecimento, despertando o meu interesse, a minha curiosidade, dedicação e carinho pela Ciência.

À banca examinadora, professora Angela, professor Antônio, professor Bruno e professora Fabiola, pelo carinho em ter aceito o convite e pela disponibilidade em ler esta dissertação.

Aos funcionários da secretaria de Neurociências, pela prestatividade e gentileza para resolver qualquer problema.

A CAPES, pelo apoio financeiro.

Muito obrigado!

SUMÁRIO

1. Introdução	12
Doença de Alzheimer	12
Enzima citocromo c oxidase.....	16
Métodos para quantificação da atividade da Cox.....	20
Metanálise.....	21
2. Relevância e justificativa	22
3. Objetivo	23
4. Materiais e métodos	23
4.1- Amostra	23
4.2- Estratégia de busca dos estudos.....	24
4.3- Métodos da revisão	24
4.4- Análise estatística.....	25
5. Resultados	27
5.1- Avaliação da atividade da enzima citocromo c oxidase (Cox) no grupo experimental e controle considerando todos os artigos incluídos na metanálise, modelo animal	28
5.2- Avaliação da atividade da enzima citocromo c oxidase (Cox) no grupo experimental e controle considerando todos os artigos incluídos na metanálise, humano.....	30
5.3- Avaliação da atividade da enzima citocromo c oxidase (Cox) no grupo experimental e controle considerando os artigos incluídos na metanálise que utilizaram o método da polarografia, considerando apenas o modelo animal	33
5.4- Avaliação da atividade da enzima citocromo c oxidase (Cox) no grupo experimental e controle considerando os artigos incluídos na metanálise que utilizaram o método da espectrofotometria, considerando apenas o modelo animal	35
5.5- Avaliação da atividade da enzima citocromo c oxidase (Cox) no grupo experimental e controle considerando os artigos incluídos na metanálise que utilizaram o método da espectrofotometria, considerando apenas o humano	37
5.6- Avaliação da atividade da enzima citocromo c oxidase (Cox) no grupo experimental e controle considerando os artigos incluídos na metanálise que utilizaram o método da colorimetria, considerando apenas o modelo animal	39

6. Discussão.....	41
Referências bibliográficas	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formação do peptídeo beta-amilóide _____	14
Figura 2. Formação dos emaranhados neurofibrilares _____	15
Figura 3. Placas senis e emaranhados neurofibrilares nos exames histopatológicos _____	16
Figura 4. Cadeia respiratória mitocondrial _____	17
Figura 5. Estrutura da enzima citocromo c oxidase mitocondrial (Cox) _____	18
Figura 6. Disfunção da enzima Cox _____	19
Figura 7. Fluxograma da revisão sistemática. _____	27
Figura 8. Espectrofotometria, polarografia e colorimetria, modelo animal _____	29
Figura 9. Espectrofotometria, polarografia e colorimetria, humano _____	31
Figura 10. Polarografia, modelo animal _____	34
Figura 11. Espectrofotometria, modelo animal _____	36
Figura 12. Espectrofotometria, humano _____	38
Figura 13. Colorimetria, modelo animal _____	40

LISTA DE ABREVIATURAS

A β - peptídeo beta-amilóide

A β 1-40- peptídeo beta-amilóide de 40 aminoácidos

A β 1-42- peptídeo beta-amilóide de 42 aminoácidos

APP- proteína precursora beta-amilóide

ApoE- Apolipoproteína E

ATP- adenosina trifosfato

Camundongos OBX- submetidos a bulbectomia olfativa

Cox- enzima mitocondrial citocromo c oxidase

DA- doença de Alzheimer

EGM- eletrodo gotejante de mercúrio

ERO- espécies reativas de oxigênio

mtDNA- DNA mitocondrial

PS-1- Presenilina 1

PS-2- Presenilina 2

RESUMO

Introdução: Há evidências de que o prejuízo das funções mitocondriais possa contribuir para danos nas sinapses e neurodegeneração, observados na doença de Alzheimer (D.A.). A neurodegeneração pode estar relacionada a alterações na atividade de enzimas mitocondriais, compondo parte dos mecanismos moleculares que culminam com a morte celular. A enzima mitocondrial citocromo c oxidase (Cox) destaca-se por ser uma enzima chave no processo de produção de energia da célula. **Objetivo:** Analisar se existe associação entre alterações na atividade da Cox mitocondrial e a D.A.. **Métodos:** Foram utilizados os bancos de dados *Pubmed*, *Scopus*, *Medline*, *Lilacs*, *Eric* e *Cochrane*. Os critérios de inclusão foram estudos publicados até 2016, com avaliação da atividade da enzima, que: (i) envolveram indivíduos humanos e modelos animais de D.A.; (ii) dados originais, obtidos utilizando métodos de espectrofotometria, colorimetria e/ou polarografia. Os critérios de exclusão foram estudos que: (i) não avaliaram a atividade da enzima; (ii) não estiveram relacionados à D.A. ;(iii) faltaram dados. Os dados foram tabulados em planilhas do *Excel* e analisados pelo programa *RevMan*. Foi adotado modelo de efeitos aleatórios para estimativa do efeito. **Resultados:** Foram encontrados 1372 artigos, sendo que desses, 23 preencheram os critérios de inclusão. Os resultados foram obtidos a partir dos dados dos 23 artigos. Os dados mostram diminuição na atividade da Cox no grupo afetado pela D.A.. **Conclusão:** Concluimos que a Cox pode representar um componente importante nos mecanismos moleculares subjacentes à D.A.. Essa enzima pode representar um possível novo biomarcador para a doença como pode ser um possível alvo de tratamento ou vir a ser utilizada como mais um método de diagnóstico complementar.

ABSTRACT

Introduction: There is evidence that the impairment of mitochondrial functions may contribute to damages in synapses and neurodegeneration, observed in Alzheimer's disease (A.D.). Neurodegeneration may be related to changes in the activity of mitochondrial enzymes, forming part of the molecular mechanisms that culminate in cell death. The mitochondrial enzyme cytochrome c oxidase (Cox) stands out as being a key enzyme in the cell's energy production process. **Objective:** To analyze if there is an association between alterations in mitochondrial Cox activity and A.D.. **Methods:** The Pubmed, Scopus, Medline, Lilacs, Eric and Cochrane databases were used. The inclusion criteria were studies published until 2016, with evaluation of enzyme activity, which: (i) involved human individuals and animal models of A.D. .; (ii) original data, obtained using spectrophotometry, colorimetry and / or polarography methods. The exclusion criteria were studies that: (i) did not evaluate the activity of the enzyme; (ii) were not related to A.D., (iii) data were missing. The data were tabulated in Excel spreadsheets and analyzed by the RevMan program. A random effects model was adopted to the estimative of the effect. **Results:** 1372 articles were found, 23 of them fit the inclusion criteria. The results were obtained from the data of these 23 articles. The data show a decrease in the activity of the Cox in the group affected by A.D.. **Conclusion:** We concluded that Cox may represent an important component in the molecular mechanisms underlying AD. This enzyme may represent a possible new biomarker for the disease as it may be a possible treatment target or may be used as another complementary diagnostic method .

1. Introdução

Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA) é a mais comum causa das demências, sendo responsável por 60% a 70% dos casos, acometendo cerca de 47,5 milhões de pessoas em todo o mundo. Ainda, conforme estimativas, o número de indivíduos acometido pela DA em 2050 pode chegar a 135 milhões. Além disso, tem significativo impacto físico, psicológico, social e econômico, tanto sobre os cuidadores, como sobre os familiares dos que manifestam a DA ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS, 2017).

A DA não faz parte do processo de envelhecimento normal e é caracterizada pelo déficit na memória e pelo menos uma das seguintes alterações cognitivas: afasia, apraxia, agnosia, deterioração da função executiva. O déficit cognitivo consiste no principal sintoma da DA, levando a um significativo prejuízo funcional no trabalho e nas relações sociais. Em fases mais avançadas da doença, o indivíduo geralmente apresenta perturbação da marcha e mioclonia. Ocorrem convulsões em aproximadamente 10% dos casos (MANUAL DIAGNÓSTICO E ESTATÍSTICO DE TRANSTORNOS MENTAIS, 1994).

A doença de Alzheimer pode ser de 2 tipos: a esporádica, de início tardio, e a familiar. A primeira é a forma clinicamente predominante, na maioria dos casos, ocorrendo com início tardio e não é hereditária. Os mecanismos de acumulação do peptídeo beta-amilóide bem como os mecanismos de sua toxicidade neuronal nessa forma, permanecem desconhecidos (AVETISYAN et al., 2016).

A forma familiar é hereditária, de início precoce, causada em alguns casos por mutações em 3 genes: o gene da proteína precursora de beta-amilóide (APP), o gene da presenilina 1 (PS-1) e presenilina 2 (PS-2). Essas mutações alteram o metabolismo da APP, aumentando a formação de AB-42 (FREITAS et al., 2013). Em um estudo bem abrangente envolvendo todos os gêmeos registrados na Suécia, com idade superior a 65 anos, foi confirmado, para o desenvolvimento da doença, a presença de uma grande influência da herança genética, tanto para os homens como para as mulheres (GATZ et al., 2006).

O fator de risco mais importante para o aparecimento da DA é a idade, havendo unanimidade de que há um aumento exponencial na incidência e prevalência da doença à medida que a pessoa envelhece (LAGE, 2002). A probabilidade de diagnóstico da doença dobra a cada cinco anos em pessoas na faixa etária de 65 a 85 anos (VAS et al., 2001). Ainda, a prevalência da doença é maior em mulheres do que em homens. Essa diferença está relacionada ao fato de as mulheres viverem mais anos depois de terem desenvolvido a demência (LAGE, 2002). Além disso, o estrógeno pode promover neuroproteção, envolvendo a habilidade desse hormônio em modular a apolipoproteína E (apoE), gene de susceptibilidade para a doença de Alzheimer, e seu receptor (LRP) (STRUBLE et al., 2008).

O diagnóstico clínico da DA é feito com base no aparecimento dos sintomas e a partir da exclusão das outras demências. Contudo, a DA só é confirmada a partir do exame anatomopatológico *post mortem* do encéfalo. O paciente deve apresentar os seguintes marcadores anatomopatológicos, já descritos pelo Dr. Alzheimer em 1906, que são: acúmulo de placas senis, emaranhados neurofibrilares, morte neuronal com diminuição do volume encefálico e alargamento dos sulcos e ventrículos (MANUAL DIAGNÓSTICO E ESTATÍSTICO DE TRANSTORNOS MENTAIS, 1994).

As placas senis são formadas pela agregação do peptídeo beta-amilóide (A β) e este é formado a partir da clivagem da proteína precursora beta-amilóide (APP), pelas enzimas β - e γ -secretases, levando à formação de sua forma monomérica, contendo 40 ou 42 aminoácidos (figura 1).

O peptídeo A β , em condições patológicas, pode também se agregar formando oligômeros, que são potencialmente tóxicos, levando à desregulação de vias de sinalização (p.e., Fyn, FAK, GSK3 β e CDK5) e a possíveis alterações no citoesqueleto (p.e., envolvendo as proteínas *TAU* e tubulina) e nas proteínas sinápticas (p.e., Arc e Drebrina), com subsequente dano neuronal (CREWS; MASLIAH, 2010). A proteína APP pode também ser clivada pelas enzimas alfa e gama secretases, não havendo a formação do peptídeo beta-amilóide, caracterizando a via não amiloidogênica (DE STROOPER et al., 2010)

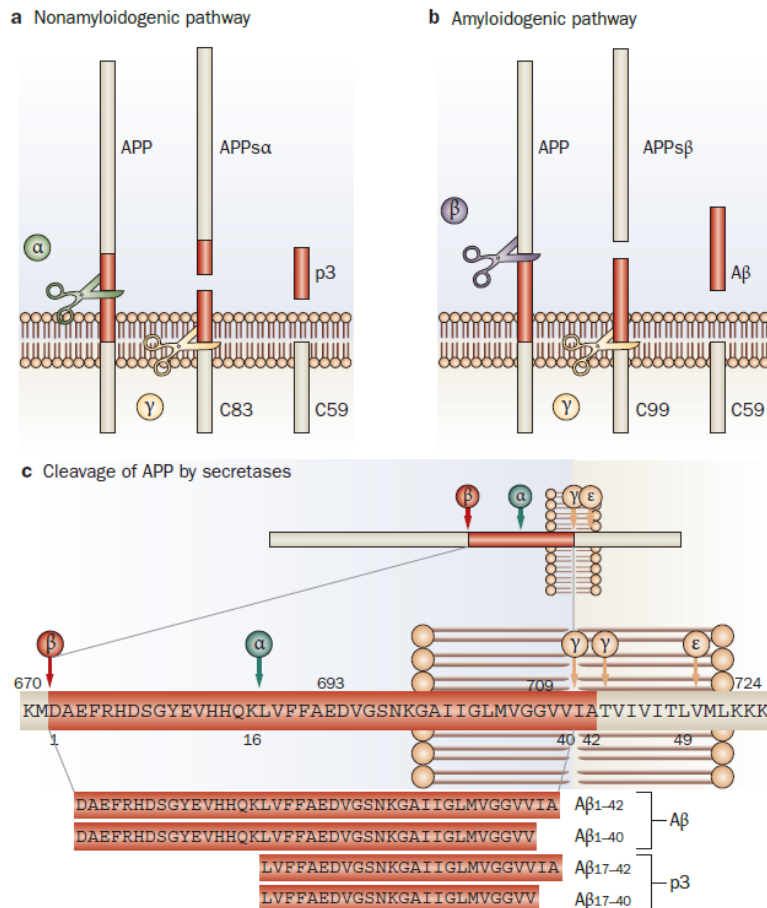


Figura 1- Formação do peptídeo beta-amilóide. a) A clivagem da proteína precursora de beta-amilóide (APP) pelas enzimas alfa e gama secretases forma o peptídeo p3, caracterizando a via não amiloidogênica. b) Quando a proteína APP é clivada pelas enzimas beta e gama secretases, há a formação do peptídeo beta-amilóide, caracterizando a via amiloidogênica. Em condições patológicas, esses peptídeos tendem a se aglomerar, formando as placas senis. c) A clivagem de APP pelas enzimas beta e gama secretases pode gerar peptídeos beta-amilóide de 40 ou 42 aminoácidos. Já a clivagem pelas enzimas alfa e beta secretases forma peptídeos de 16 aminoácidos. Retirada de De Strooper et al., 2010.

Outro marcador anatomopatológico são os emaranhados neurofibrilares, (figura 2), que são acúmulos de filamentos pareados helicoidais de proteína *TAU* hiperfosforiladas no espaço citoplasmático do neurônio. Essa hiperfosforilação tende a desestruturar a *TAU* e a tubulina, proteínas do citoesqueleto neuronal importantes para a estabilização dos microtúbulos, ocasionando, assim, a morte da célula. Para que esse processo aconteça, ele parece ser dependente do acúmulo de peptídeo A β (BARTEN; ALBRIGHT, 2008).

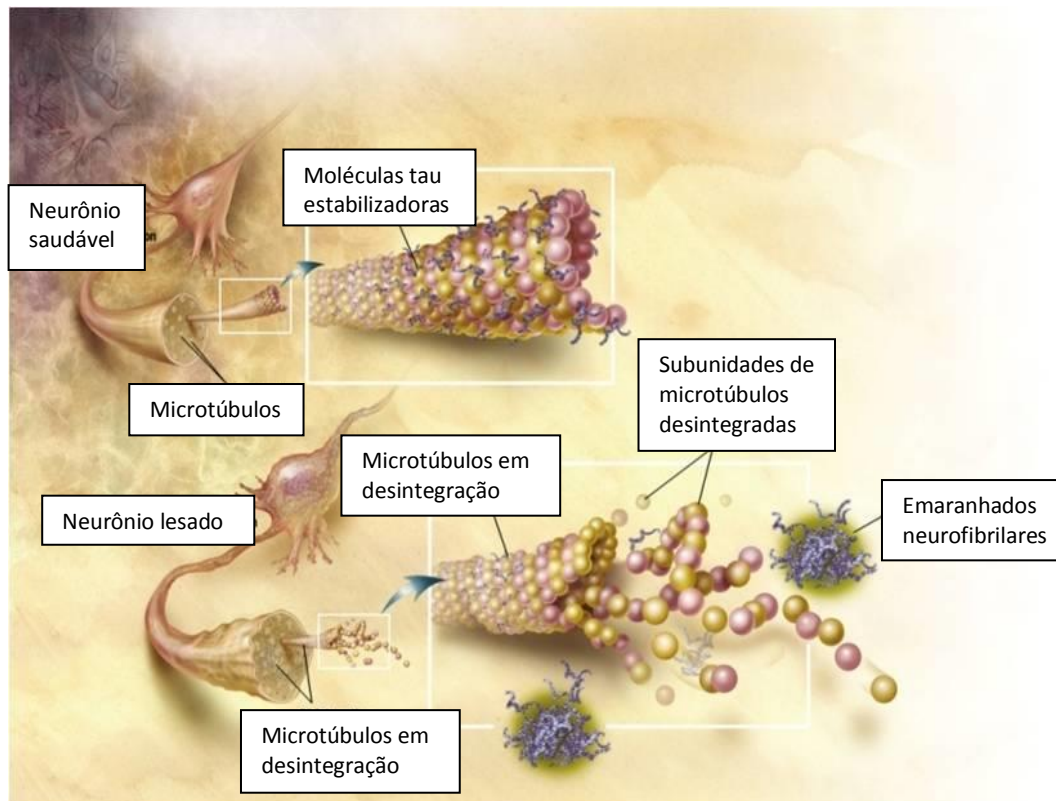


Figura 2 – Formação dos emaranhados neurofibrilares. No neurônio saudável, a proteína tau é muito importante na formação dos microtúbulos, que compõem o citoesqueleto do neurônio. No neurônio lesado, há a hiperfosforilação da proteína tau, que se agrega e forma os emaranhados neurofibrilares, levando à morte. Retirada de https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/51/TANGLES_HIGH.jpg.

As alterações decorrentes da hiperfosforilação da *TAU* parecem também regular e serem reguladas por alterações em proteínas relacionadas à formação de sinapses como *Arc* e sinapsina (CREWS; MASLIAH, 2010). A perda de comunicações sinápticas é o parâmetro que melhor se correlaciona com os declínios cognitivos apresentados pelos pacientes com DA (PALOP; MUCKE, 2010).

Em pacientes com DA, o acúmulo do peptídeo $A\beta$ na mitocôndria (figura 3) acontece antes de sua deposição extracelular. Esse peptídeo pode ser deletério por promover o aumento do estresse oxidativo, pela produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), e por inibir enzimas mitocondriais. A consequência desses eventos leva ao prejuízo do funcionamento da organela, diminuindo a produção de adenosina trifosfato (ATP), aumentando o influxo de cálcio e, inclusive, podendo danificar o DNA mitocondrial (mtDNA). (GIBSON et al., 1998; READNOWER et al., 2011). O comprometimento de funções mitocondriais como respiração celular e produção de ATP pode contribuir para danos na transmissão sináptica e morte neuronal, que são observados na

doença de Alzheimer e outras doenças neurodegenerativas (CAVALLUCCI et al., 2013).

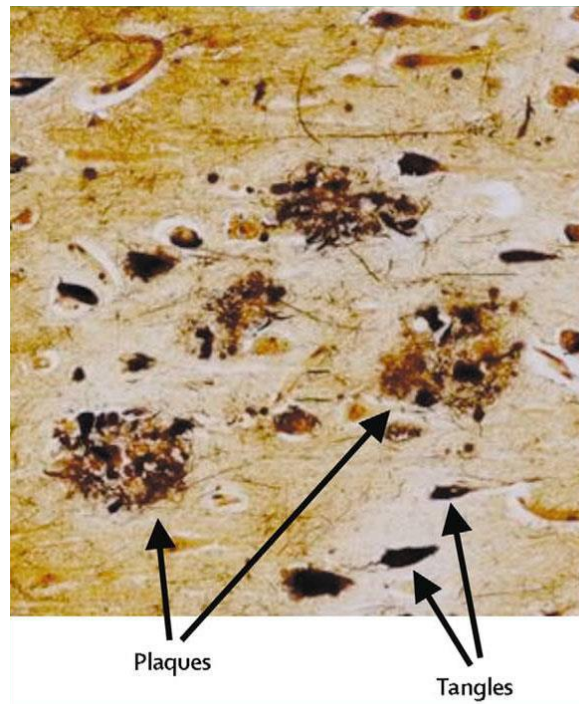


Figura 3- Placas senis e emaranhados neurofibrilares nos exames histopatológicos. Retirada de <http://hozeknows.co.uk/2013/12/09/plaques-tangles/>.

Diante da importância da mitocôndria e de suas enzimas para a sobrevivência do neurônio, abordamos uma enzima mitocondrial de grande relevância chamada de citocromo c oxidase. A seguir, serão destrinchadas suas características, composição, função e disfunção.

Enzima citocromo c oxidase

A enzima citocromo c oxidase (abreviada na forma Cox, que deve ser diferenciada da abreviatura da enzima ciclo-oxigenase, COX), também chamada de complexo IV, é o quarto complexo da cadeia respiratória, muito importante na produção de energia da célula. Está localizada na membrana interna da mitocôndria (figura 4).

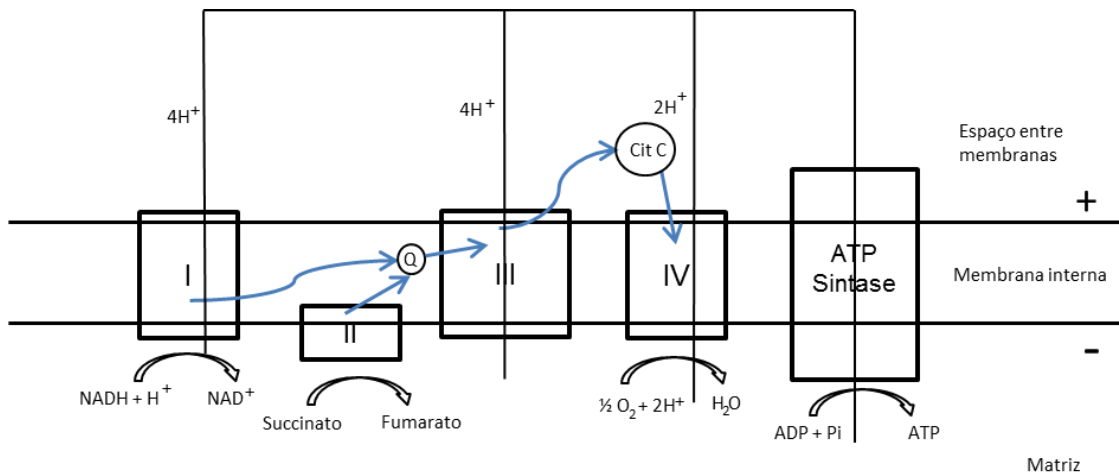


Figura 4- Cadeia respiratória mitocondrial. O sistema é composto de 5 complexos. A enzima Cox é o quarto complexo da cadeia e é essencial na produção de ATP pela célula, sendo o terminal oxidase do processo. Modificado de Piomboni et al., 2012.

Desde sua descoberta em 1929, a Cox tem sido muito estudada, sendo considerada um dos mais importantes assuntos na bioenergética, devido a importante reação que participa e sua importância fisiológica (WARBURG; NEGELEIN, 1929). A enzima é constituída de 13 subunidades e é o terminal oxidase da cadeia respiratória mitocondrial em mamíferos. As 3 maiores são codificadas no DNA mitocondrial e as outras 10 são produtos de genes nucleares, que são traduzidos nos ribossomos do citosol e importados por transportadores como TIM e TOM para compartimentos da mitocôndria, sendo possivelmente modificados antes de participarem da montagem da enzima (PIERRON et al., 2012; KADENBACH; HUTTEMANN, 2015).

As subunidades da enzima Cox têm a função de catalisadores na transferência de elétrons para a molécula de oxigênio, a partir do citocromo c, havendo formação de água. (RAK et al., 2016). O número de subunidades varia nos organismos de diferentes ordens filogenéticas. Por exemplo, nas bactérias são encontradas 4 subunidades, 12 no fermento e, nos vertebrados, 13 (LINDER; FREUND; KADENBACH, 1995).

Nos mamíferos, as subunidades maiores e evolutivamente conservadas são a 1, 2 e 3. Elas formam o núcleo catalítico da enzima (figura 5) e contém os centros de óxido-redução heme e cobre. Não apenas nos mamíferos, mas nos vertebrados em geral, as subunidades VIa, VIIa, e VIII são expressas como isólogos L e H (ANTHONY et al., 1990; LIGHTOWLERS et al., 1990; YANAMURA et al., 1988). A diferença entre os isólogos L e H é que os primeiros são expressos em todos os tecidos, enquanto os outros são

expressos exclusivamente no músculo cardíaco e esquelético (LIGHTOWLERS et al., 1990; SCHLERF et al., 1988; SEELAN; GROSSMAN, 1991).

- Complexo IV - Citocromo C - Oxidase

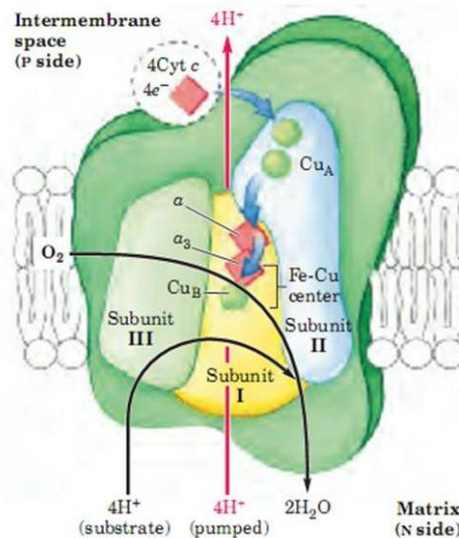


Figura 5- Estrutura da enzima citocromo c oxidase mitocondrial (Cox). A enzima apresenta 3 subunidades e contém 2 íons cobre e 2 citocromos do tipo a. Cada íon está ligado a um dos 2 citocromos. O complexo está localizado na membrana interna da mitocôndria e doa 4 elétrons para o oxigênio molecular. Esse se liga aos prótons do meio, formando água. Retirada de https://www.google.com.br/search?q=citocromo+c+oxidase&client=firefox-b-ab&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwi73OvB3d3RAhWGS5AKHTJ6B-gQ_AUICCG&biw=1366&bih=657#imgrc=0aZXNF2HqLhYrM:

O local de ligação ADP/ATP é um importante mecanismo para a regulação alostérica da atividade da enzima, que se refere diretamente ao estado bioenergético da célula (SRINIVASAN; AVADHANI, 2012). As diferenças encontradas no tecido do local de ligação ADP/ATP da enzima Cox parecem estar relacionadas aos isólogos L e as subunidades VIaH (HUTTEMANN; FRANK; KADENBACH, 1999). Além da ligação ADP/ATP, a Cox apresenta 2 estruturas de cobre e 2 de ferro, além de conter também estruturas de magnésio e zinco (MALMSTROM et al, 1990). Evidências sugerem que o aumento da produção das espécies reativas de oxigênio da mitocôndria e sua consequente toxicidade celular estão relacionadas à disfunção da enzima Cox (SRINIVASAN; AVADHANI, 2012) e esse fenômeno ocorre na doença de Alzheimer. A disfunção da enzima, um defeito parcial na mesma, pode levar a consequências graves (RAK et al., 2016). Muitos trabalhos relacionados à doença têm mostrado que a perda da atividade da enzima está relacionada à idade. Contudo, existem muitas outras condições

patológicas que levam a alterações na função dessa enzima nas células e tecidos (PARADIES et al., 1993; SOHAL, 1993), por exemplo: perda das subunidades, defeitos na sua montagem, inibição da sua atividade e desmontagem do supercomplexo (figura 6). As consequências desses eventos são baixa produção de ATP, aumento da formação de espécies reativas de oxigênio na mitocôndria e acidose láctica (SRINIVASAN; AVADHANI, 2012).

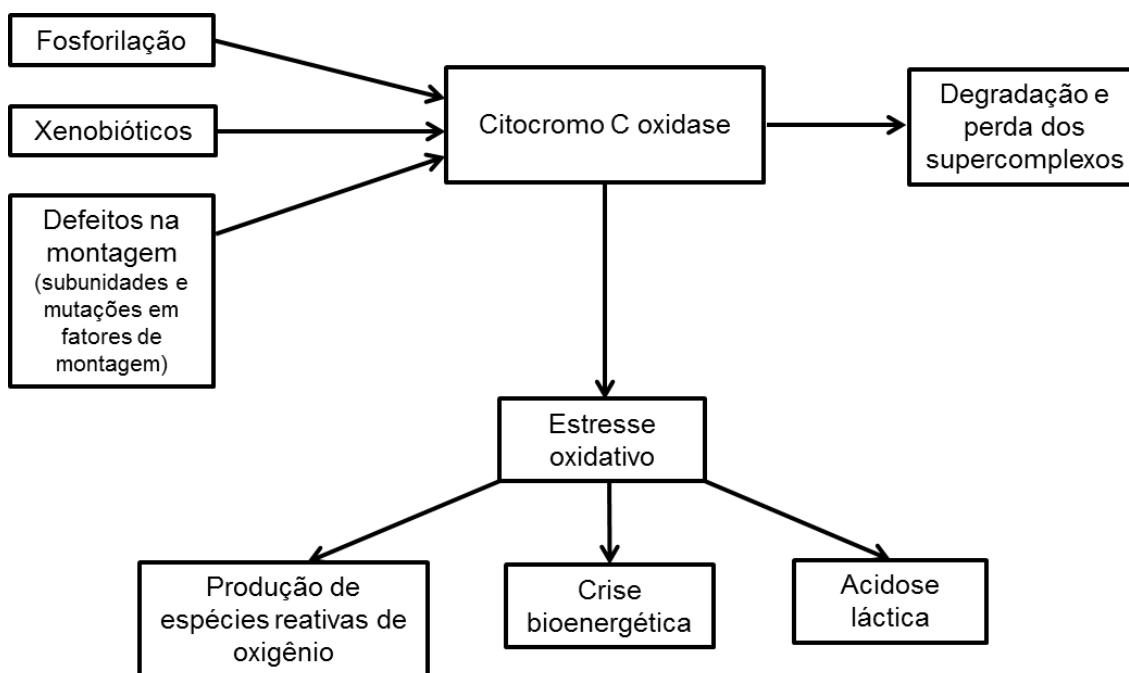


Figura 6- Disfunção da enzima Cox. Em muitas doenças como o Alzheimer, a disfunção de Cox promove o estresse oxidativo. Esse estresse oxidativo leva a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), crise bioenergética, e acidose láctica. Alguns fatores que causam a disfunção da enzima são: fosforilação, xenobióticos e defeitos na montagem das subunidades, devido a mutações. Esses mecanismos levam a perda dos supercomplexos, desmontagem da organização dessas estruturas da cadeia respiratória mitocondrial. Modificado de Srinivasan & Avadhani, 2012.

Em relação a doenças genéticas, mutações em mais de 20 genes nucleares e mitocondriais associados à deficiência de Cox levam a diversos fenótipos. Os seguintes fatores podem influenciar a severidade e manifestações clínicas de uma mutação na enzima: a intensidade da deficiência, o órgão comprometido pela mutação e a capacidade de lidar com o defeito na enzima, que muda de paciente para paciente (RAK et al., 2016). Uma perda primária da enzima pode ter efeitos na organização da cadeia respiratória, provocando fenótipos bioquímicos (DIAZ et al., 2006; SAADA et al., 2012).

Três métodos importantes para a quantificação da atividade da enzima Cox foram abordados neste trabalho, que são: polarografia, colorimetria e espectrofotometria. A seguir, será explicado o funcionamento desses métodos.

Métodos para quantificação da atividade da Cox

A atividade da Cox pode ser quantificada pelos métodos de polarografia, colorimetria e espectrofotometria. O primeiro é um método em que a reação de interesse ocorre no eletrodo de trabalho, chamado de eletrodo gotejante de mercúrio (EGM). Faz parte deste método um eletrodo de referência e um micro-eletrodo de trabalho. É feita a medida e interpretação da relação existente entre a corrente e o potencial entre esses dois eletrodos citados anteriormente, durante a decomposição do composto em seus componentes de uma solução que não foi agitada (SANTOS, 1994). Já o segundo método mede a intensidade de luz que uma solução transmite. Através dessa intensidade mensurada, se faz a determinação quantitativa da substância de interesse dissolvida na solução (MOURA et al., 2015). Por fim, a espectrofotometria é um método que determina a concentração de soluções através da absorção de luz. O espectrofotômetro analisa a absorção da resultante dos comprimentos de onda que compõem uma solução a partir de um estímulo luminoso (MOURA et al., 2015).

A revisão sistemática e metanálise, muito importantes para o agrupamento de artigos, foram utilizadas neste trabalho e serão apresentadas a seguir.

Revisão sistemática

A revisão sistemática é um importante método para a avaliação simultânea de um grupo de dados. É mais utilizada na área da saúde, relacionada a intervenções nesse setor (ATALLAH; CASTRO, 1998). Além disso, é um método muito relevante para identificar, reunir e analisar criticamente os estudos da literatura referentes a um determinado tema.

Para realizar a revisão sistemática, primeiro se faz a pergunta da pesquisa. Depois, procura-se na literatura se já existe uma revisão sobre o tema de interesse. Caso não exista, se faz a elaboração do projeto de pesquisa. Após esse passo, se faz a busca dos artigos através das palavras-chave e critérios de inclusão e exclusão. A busca pelos artigos pode ser feita

por um revisor ou mais revisores. Se for feita por mais revisores, se faz uma reunião de consenso para discutir os artigos incluídos e excluídos. Após a seleção dos artigos a serem incluídos na revisão, se faz a tabulação dos dados, seguida da interpretação dos dados, culminando no resultado final do projeto (ROSS et al., 1999).

Metanálise

A metanálise é um método estatístico que permite agrupar os dados de vários estudos e analisá-los como se fossem retirados de apenas um amplo estudo, produzindo estimativas que resumem o todo, chamadas de estimativas metanalíticas (RODRIGUES; ZIEGELMANN, 2010). Esse método quantitativo combina os dados oriundos de uma revisão sistemática.

A metanálise pode ser realizada em todas as áreas, sendo uma ferramenta poderosa na síntese de dados de estudos anteriores da literatura. Por essas razões, institutos de saúde e agências governamentais em vários países têm encorajado e requisitado pesquisadores para conduzir metanálise de pesquisa com os dados existentes antes de financiar novos trabalhos (BORENSTEIN et al., 2009).

As tentativas de unir os dados de vários estudos são antigas. A primeira metanálise realizada foi do estatístico Karl Pearson em 1904. Ele agrupou dados de 5 artigos, que avaliaram a eficácia da prevenção de inoculações contra a febre entérica (PEARSON, 1904).

Muitos estudos individuais são pequenos, com baixo poder e peso, para se inferir uma conclusão confiável deles isoladamente. Logo, se justifica realizar uma metanálise, combinando esses estudos individuais, como se eles estivessem sido retirados de apenas um amplo estudo, bem abrangente, permitindo uma conclusão muito mais próxima da realidade (WHITEHEAD, 2002).

Nesse contexto, o presente projeto objetiva realizar uma revisão sistemática seguida de metanálise, focando identificar a relação da enzima Cox com a DA. Dessa forma, os resultados oriundos desse trabalho podem representar um primeiro passo no sentido de nortear futuras pesquisas, áreas básica ou clínica, voltadas para o tratamento e/ou diagnóstico da DA.

2. Relevância e justificativa

Atualmente 47,5 milhões de pessoas têm diagnóstico clínico da DA, sendo ela a causa mais comum das demências. Ainda, a cada ano cerca de 7,7 milhões de pessoas desenvolve a DA, perfazendo uma das principais causas de incapacidade e dependência na população idosa em todo o mundo. Além disso, tal doença tem significativo impacto físico, psicológico, social e econômico, tanto sobre os familiares como os cuidadores dos pacientes.

Dados obtidos em vários estudos têm revelado possíveis anormalidades no funcionamento mitocondrial em indivíduos acometidos pela DA e em modelos experimentais desta doença. No entanto, ainda não se conhece a exata contribuição dessa organela para a manifestação dessa doença. A mitocôndria pode ser uma organela chave na DA, por causa da sua relação com a apoptose e consequente morte neuronal, observados nas doenças neurodegenerativas. Outras importantes funções da organela, como produção de energia e respiração celular, parecem estar prejudicadas na DA. Somado a isso, existem evidências de que alterações no metabolismo mitocondrial cerebral podem estar relacionadas ao prejuízo cognitivo presente em pacientes com DA.

Outras evidências mostram que o comprometimento das funções mitocondriais podem contribuir para danos na transmissão sináptica e neurodegeneração, observados na doença de Alzheimer (DA). Alterações na atividade de enzimas mitocondriais podem compor parte dos mecanismos moleculares relacionados à neurodegeneração na DA. Dentre essas enzimas, destaca-se a citocromo c oxidase (Cox), essencial no processo de produção de energia celular e manutenção da homeostase do organismo. Por causa de sua importância fisiológica e relevante reação catalisada, essa enzima tem sido estudada como um dos mais importantes assuntos em bioenergética desde sua descoberta (TSUKIHARA et al., 1996).

Muitos autores mostram em seus trabalhos diminuição na atividade da enzima no grupo afetado pela DA, outros mostram que não houve alteração na atividade da enzima nesse grupo e outros mostram aumento da atividade no grupo afetado. Nesse contexto, o presente trabalho, através da revisão sistemática e metanálise, objetiva analisar a relação da enzima Cox com a DA. Os resultados originados deste projeto podem representar um primeiro passo

no sentido de nortear futuras pesquisas, voltadas para o tratamento e/ou diagnóstico da DA.

3. Objetivo

Analisar se existe associação entre alterações na atividade da Cox mitocondrial e a doença de Alzheimer.

4. Materiais e métodos

4.1- Amostra

4.1.1- *Tamanho da amostra*

Os dados foram coletados por meio de uma revisão sistemática utilizando os bancos de dados gratuitos com uma estratégia de busca especificada por palavras-chave. Foram analisados todos os estudos encontrados com a estratégia de busca especificada e que preencheram os critérios de inclusão e de exclusão, apresentados a seguir.

4.1.2- *Critérios de inclusão*

Foram incluídos na análise os estudos publicados envolvendo avaliação da atividade da enzima mitocondrial citocromo c oxidase que:

- Envolveram indivíduos humanos com DA;
- Envolveram modelos animais de DA;
- Escritos em inglês ou português;
- Utilizaram dados originais.

4.1.3- *Critérios de exclusão*

Foram excluídos da análise os estudos em que:

- Não há avaliação da atividade da enzima citocromo c oxidase;
- Não há relação com a Doença de Alzheimer;
- Os resultados sofreram influência de algum tipo de tratamento;
- Os dados representaram publicação duplicada do mesmo autor;
- Não foram utilizados modelos animais ou amostras biológicas obtidas de seres humanos;
- Não foram apresentados dados originais (tais como, artigos de revisão, cartas para o editor, capítulos de livros);
- Há a participação de somente 1 indivíduo;
- Faltaram dados.

4.2- Estratégia de busca dos estudos

A busca foi realizada usando palavras-chave em inglês e foram selecionados artigos publicados até 2016, que preencheram os critérios de inclusão. A estratégia de busca se baseou nas palavras-chave seguintes: *Alzheimer AND Cox AND mitochondria; Alzheimer AND cytochrome c oxidase AND mitochondria; Alzheimer AND complex IV AND mitochondria.*

Busca eletrônica

Para identificar estudos relevantes potencialmente utilizáveis, desconsiderando o gênero e origem da publicação, foram usadas as seguintes bases de dados gratuitas:

- Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)
- Scopus (<https://www.scopus.com/home.uri>)
- Medline
(<http://web.a.ebscohost.com.ez27.periodicos.capes.gov.br/ehost/search/basic?sid=393827ba-121e-43e0-80f5-3a1520309324%40sessionmgr4005&vid=0&hid=4114>)
- Lilacs (<http://lilacs.bvsalud.org/>)
- Eric (<http://eric.ed.gov/>)
- Cochrane (<http://cochrane.bireme.br/portal/php/index.php>)

4.3- Métodos da revisão

4.3.1- Seleção de estudos

A seleção dos artigos foi feita incluindo todos os estudos na análise que preencheram os critérios de inclusão. Foi utilizado o programa ENDNOTE™ basic versão virtual (endereço <http://endnote.com/product-details/basic>), da Thomson Reuters, para a alocação dos resumos e dos artigos lidos e selecionados para a pesquisa. A busca foi feita considerando as palavras-chave que apareceram no título ou no resumo dos artigos, para uma maior especificidade.

4.3.2- Extração de dados

Os dados dos artigos incluídos foram tabulados em uma planilha do Excel™ com as variáveis: artigo, alteração mitocondrial, método, medição, resultados, estatística, tratamento, amostra biológica, exatidão, valor, unidade, tamanho da amostra e grupos. Após a tabulação, os artigos foram agrupados

buscando manter homogeneidade dentro do mesmo grupo. Dentre as formas de agrupamento, foram considerados os métodos utilizados e a natureza da amostra (humano ou modelo animal).

Os dados foram submetidos no programa Revman, versão 5.3 (endereço <http://tech.cochrane.org/revman/>).

4.4- Análise estatística

Os estudos selecionados foram avaliados por meio de metanálise realizada com o auxílio do programa RevMan, versão 5.3 (endereço <http://tech.cochrane.org/revman/>).

Em cada estudo, o tamanho do efeito da Doença de Alzheimer foi calculado por meio da diferença entre as médias da atividade da Cox em grupos de indivíduos afetados e não afetados (controle). Como os estudos selecionados apresentam diferentes métodos de medição da atividade da Cox, com diversas escalas e unidades de medida, a diferença entre as médias foi padronizada dividindo-a pela variabilidade observada em cada estudo. A medida de diferença global, ou seja, o valor que reflete a magnitude do efeito da DA na atividade da Cox em grupos de pacientes afetados, foi calculada por meio de um modelo de metanálise com efeitos aleatórios, cujo pressuposto é de que o efeito de interesse não é o mesmo para todos os estudos.

Após o cálculo do efeito global, ou da diferença global entre os grupos, efetuou-se um teste de hipóteses, em que a hipótese nula é a ausência de diferença entre os grupos, ou seja, a diferença global é igual a zero.

A estimativa da diferença global entre os grupos afetados e não afetados é uma média ponderada dos estudos individuais em que os pesos são o inverso da variabilidade de cada estudo. Essa variabilidade é soma da variância dentro de cada estudo e a medida de heterogeneidade entre os estudos.

Em metanálise, as formas mais usuais de se medir a heterogeneidade entre os estudos, é por meio do teste Q de Cochran, pela medida Tau^2 ou pela estatística I^2 de Higgins e Thompson (2002).

No teste Q de Cochran, as hipóteses a serem testadas são H_0 os estudos são homogêneos versus H_1 : os estudos são heterogêneos. A hipótese nula é rejeitada para valores altos de Q, que é a medida de variação total. Ou seja, quanto maior o valor de Q, maior a heterogeneidade. Sob H_0 , Q segue

uma distribuição qui-quadrado com $(r-1)$ graus de liberdade, sendo r o número de estudos incluídos na análise.

A medida Tau^2 é definida como a variância do verdadeiro efeito global dos estudos. Valores de Tau^2 próximos de zero sugerem a ausência de heterogeneidade entre os estudos.

A estatística I^2 é uma maneira de se quantificar a heterogeneidade independentemente da escala em que as medidas foram tomadas. Enquanto Q quantifica a heterogeneidade total, I^2 mede a proporção da variação observada que é devida à heterogeneidade entre os estudos.

Se o valor de I^2 for próximo de zero, significa que maior parte da variação observada se deve a erro aleatório, não havendo indicação de heterogeneidade. Por outro lado, se o valor de I^2 for alto, faz sentido a utilização de técnicas para se identificar as razões dessa variação.

A quantidade I^2 também pode ser vista como uma medida de inconsistência entre as conclusões dos estudos. De acordo com (COCHRANE HANDBOOK, 2011) tem-se os seguintes limites para interpretação de I^2 : 0% a 40%: pode não ser importante em termos de heterogeneidade; 30% a 60%: pode representar heterogeneidade moderada; 50% a 90%: pode representar heterogeneidade substancial; 75% a 100%: heterogeneidade considerável.

Os resultados são apresentados em gráficos de floresta nos quais a diferença entre os grupos em cada estudo é representada por um quadrado. A localização do quadrado representa o tamanho da diferença entre os grupos, enquanto sua área reflete o peso atribuído ao estudo. As linhas horizontais são os intervalos de confiança de cada estudo. A diferença global entre os grupos é representada por um losango em que, localização (ponto médio da diagonal horizontal) e tamanho no sentido horizontal, representam, respectivamente, a estimativa pontual dessa diferença e a precisão da estimativa. A linha vertical, também chamada de linha de nulidade, representa a ausência de diferença entre os grupos. Na parte inferior do gráfico aparecem os valores relativos às medidas de heterogeneidade (Tau^2 , I^2 e o teste Q) e além do teste para o efeito global (Z).

No gráfico, os estudos com (1), (2), _1, _2, indicam diferentes comparações entre grupo controle e grupo afetado incluídas no mesmo artigo. O termo experimental se relaciona aos afetados pelo Alzheimer e controle, aos não

afetados pelo Alzheimer. Favorece experimental, no gráfico *favours [experimental]*, significa que daquele lado estão os estudos que favorecem a versão de que a atividade da Cox é menor em indivíduos afetados. E favorece controle (*favours [control]*) significa que daquele lado estão estudos que favorecem a hipótese de que a atividade da Cox é menor em indivíduos não afetados.

5. Resultados

A figura 8 representa o processo de seleção dos estudos de acordo com os critérios de inclusão e exclusão:

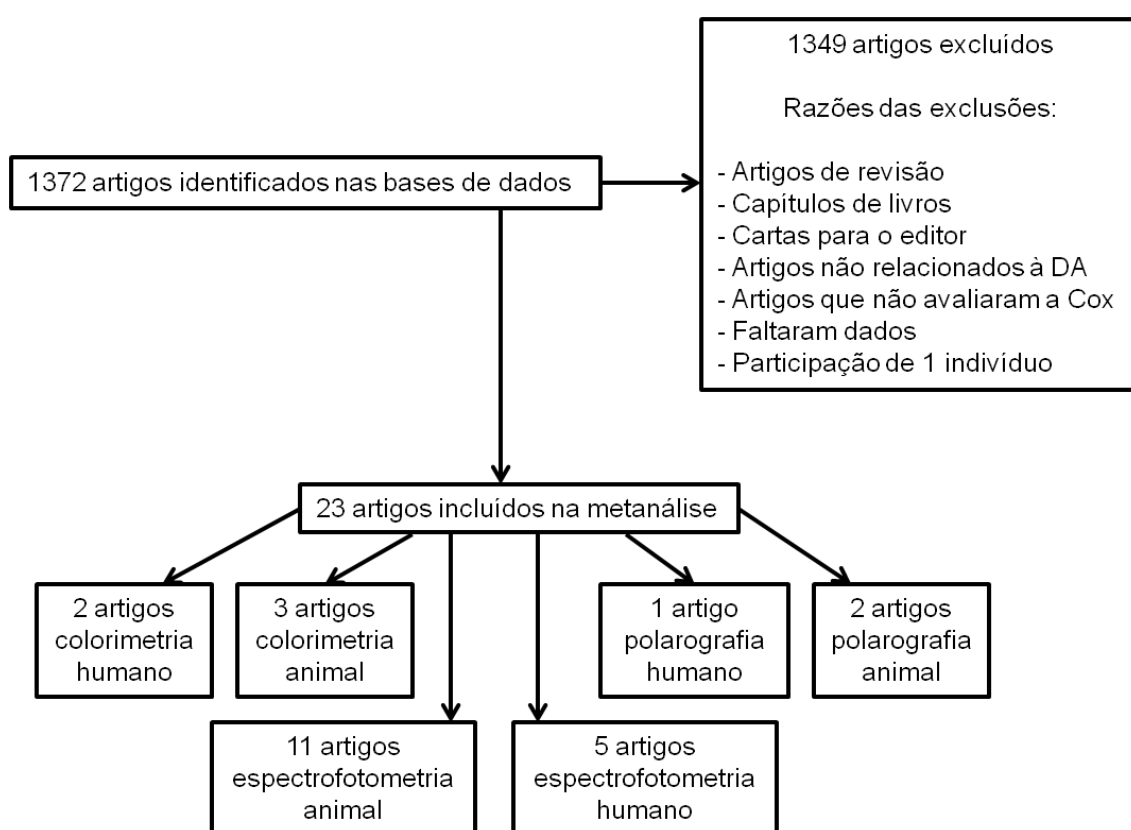


Figura 7- Fluxograma com os dados baseados nos critérios de seleção dos artigos.

A seguir são apresentados os resultados das análises conforme descrito na seção 4.4. Em todos os casos foram estimados os intervalos de confiança de 95% dos estudos individuais e do tamanho global da diferença. Em todos os testes o nível de significância foi de 5%.

5.1- Avaliação da atividade da enzima citocromo c oxidase (Cox) no grupo experimental e controle considerando todos os artigos incluídos na metanálise, modelo animal

A metanálise foi realizada com 35 estudos. Foram 35 comparações entre a atividade da enzima citocromo c oxidase no grupo afetado e não afetado (controle).

A figura 8 refere-se ao gráfico que incluiu na metanálise todos os artigos que preencheram os critérios de inclusão e que utilizaram os métodos da espectrofotometria, colorimetria e polarografia, em que foi utilizado apenas o modelo animal. A estimativa da diferença global entre os grupos foi negativa, indicando diminuição na atividade da enzima no grupo afetado pela doença de Alzheimer. Essa diferença é estatisticamente significativa ($Z= 4,96$; p-valor $<0,00001$). A hipótese de homogeneidade entre os estudos foi rejeitada ($\text{Chi}^2= 100,96$; p-valor $<0,00001$). O valor $I^2 = 66\%$ indica que 66% da variação observada se deve à heterogeneidade entre os estudos.

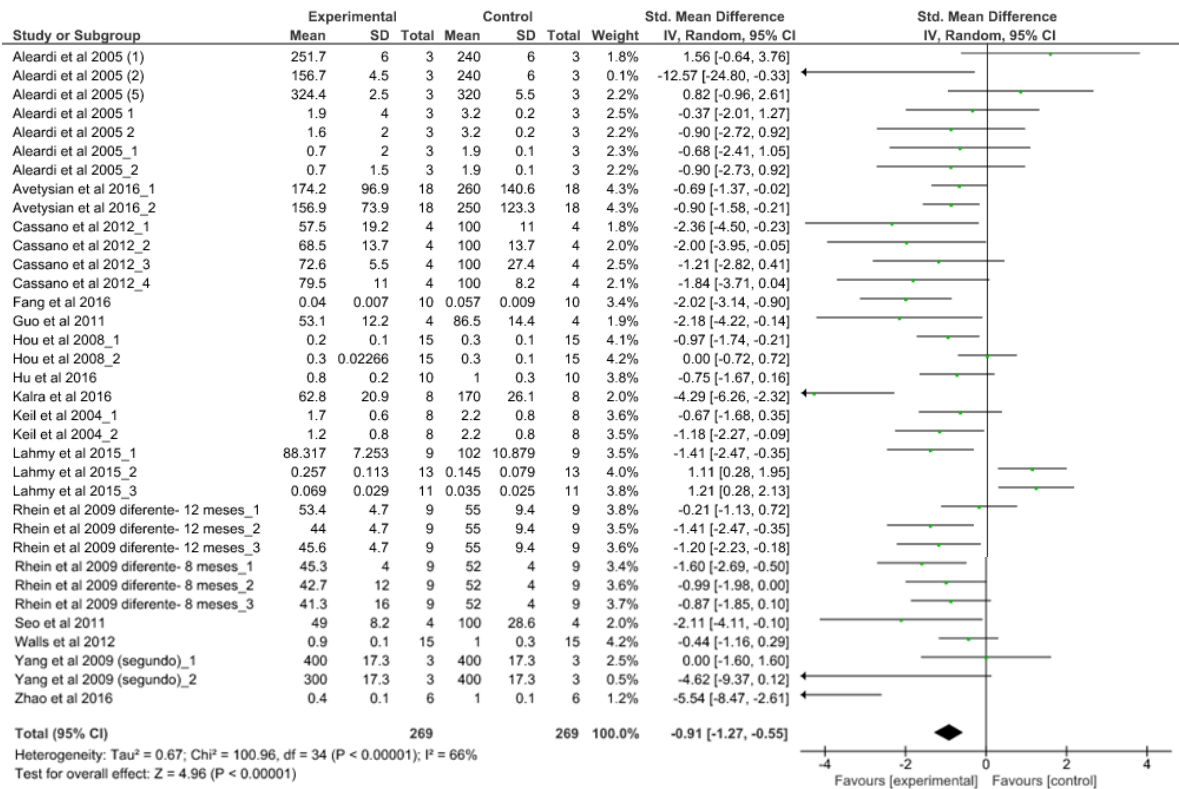


Figura 8- Avaliação da atividade de Cox no grupo experimental e controle. Metanálise realizada com 35 estudos. Gráfico global incluindo todos os artigos na metanálise que utilizaram os métodos da espectrofotometria, colorimetria e polarografia, modelo animal.

5.2- Avaliação da atividade da enzima citocromo c oxidase (Cox) no grupo experimental e controle considerando todos os artigos incluídos na metanálise, humano

A metanálise foi realizada com 16 estudos, comparando a atividade da enzima citocromo c oxidase no grupo afetado e não afetado (controle).

A figura 9 refere-se ao gráfico que incluiu na metanálise todos os artigos que preencheram os critérios de inclusão e que utilizaram os métodos da espectrofotometria, colorimetria e polarografia, em que foi utilizado apenas o humano. A estimativa da diferença global entre os grupos foi negativa, indicando diminuição na atividade da enzima no grupo afetado pela doença de Alzheimer. Essa diferença é estatisticamente significativa ($Z= 2,11$; $p\text{-valor} < 0,04$). A hipótese de homogeneidade entre os estudos foi rejeitada ($\text{Chi}^2= 1088,58$; $p\text{-valor} < 0,00001$). O valor $I^2 = 88\%$ indica que 88% da variação observada se deve à heterogeneidade entre os estudos.

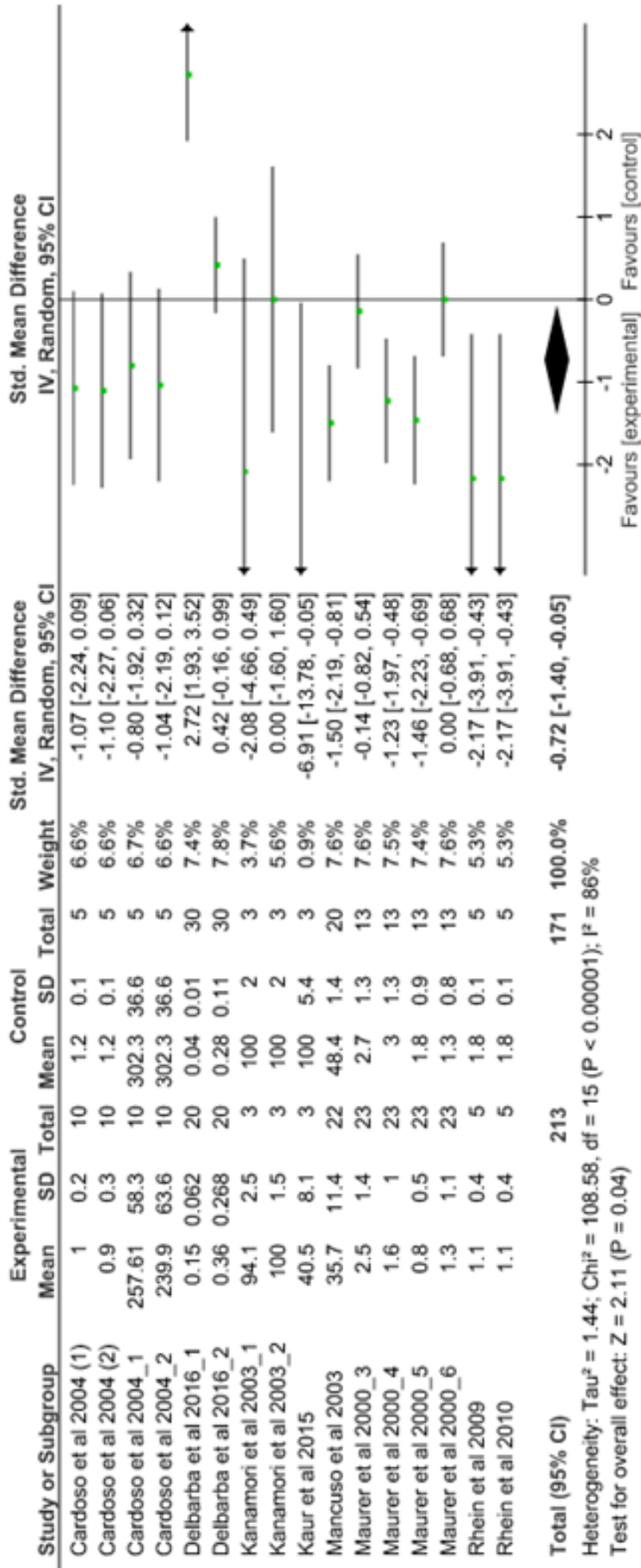


Figura 9- Avaliação da atividade de Cox no grupo experimental e controle. Metanálise realizada com 16 estudos. Gráfico global incluindo todos os artigos na metanálise que utilizaram os métodos da espectrofotometria, colorimetria e polarografia, considerando apenas o humano.

Em ambos os casos, humano e modelo animal, a heterogeneidade encontrada pode ser considerada substancial (66% e 86%). Com o intuito de se verificar possíveis fontes de heterogeneidade, as análises foram repetidas subdividindo-se o grupo animal de acordo com os métodos de quantificação da atividade da Cox (polarografia, espectrofotometria e colorimetria).

No grupo humano, a metanálise foi repetida retirando-se os estudos Kauer et al 2015, por ser o único a utilizar polarografia. Os dois estudos desse grupo que utilizaram colorimetria, apresentaram resultados idênticos (Rhein et al 2009 e Rhein et al 2010). Os resultados com as subdivisões são apresentados a seguir nos próximos gráficos de floresta.

5.3- Avaliação da atividade da enzima citocromo c oxidase (Cox) no grupo experimental e controle considerando os artigos incluídos na metanálise que utilizaram o método da polarografia, considerando apenas o modelo animal

A metanálise foi realizada com 9 estudos, comparando a atividade da enzima citocromo c oxidase no grupo afetado e não afetado (controle).

A figura 10 refere-se ao gráfico que incluiu na metanálise todos os artigos que preencheram os critérios de inclusão e que utilizaram o método da polarografia, considerando apenas o modelo animal. A estimativa da diferença global entre os grupos foi negativa, indicando diminuição na atividade da enzima no grupo afetado pela doença de Alzheimer. Essa diferença é estatisticamente significativa ($Z= 2,22$; $p\text{-valor} =0,03$). A hipótese de homogeneidade entre os estudos foi rejeitada ($\text{Chi}^2= 42,34$; $p\text{-valor} <0,00001$). O valor $I^2 = 81\%$ indica que 81% da variação observada se deve à heterogeneidade entre os estudos.

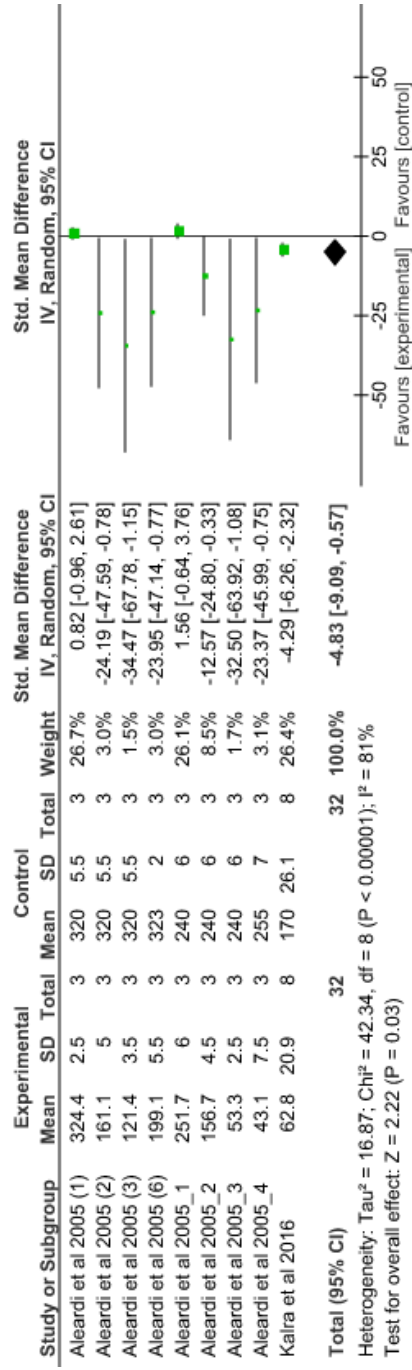


Figura 10- Avaliação da atividade de Cox no grupo experimental e controle. Metanálise realizada com 9 estudos. Gráfico incluindo todos os artigos na metanálise que utilizaram o método da polarografia, considerando apenas o modelo animal.

5.4- Avaliação da atividade da enzima citocromo c oxidase (Cox) no grupo experimental e controle considerando os artigos incluídos na metanálise que utilizaram o método da espectrofotometria, considerando apenas o modelo animal

A metanálise foi realizada com 20 estudos, comparando a atividade da enzima citocromo c oxidase no grupo afetado e não afetado (controle).

A figura 11 refere-se ao gráfico que incluiu na metanálise todos os artigos que preencheram os critérios de inclusão e que utilizaram o método da espectrofotometria, considerando apenas o modelo animal. A estimativa da diferença global entre os grupos foi negativa, indicando diminuição na atividade da enzima no grupo afetado pela doença de Alzheimer. Essa diferença é estatisticamente significativa ($Z = 3,82$; $p\text{-valor} < 0,0001$). A hipótese de homogeneidade entre os estudos foi rejeitada ($\text{Chi}^2 = 63,25$; $p\text{-valor} < 0,00001$). O valor $I^2 = 70\%$ indica que 70% da variação observada se deve à heterogeneidade entre os estudos.

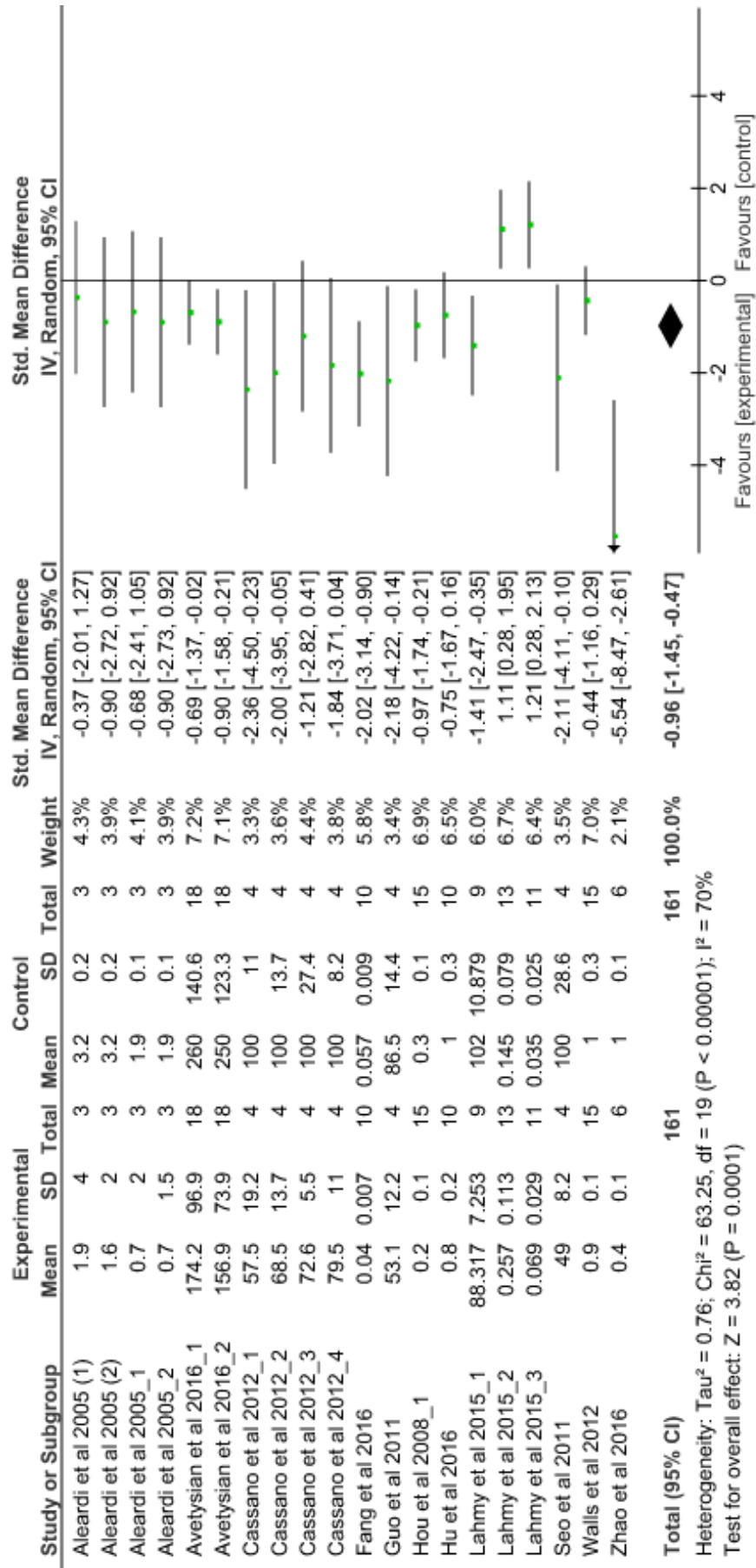


Figura 11- Avaliação da atividade de Cox no grupo experimental e controle. Metanálise realizada com 20 estudos. Gráfico incluindo todos os artigos na metanálise que utilizaram o método da espectrofotometria, considerando apenas o modelo animal.

5.5- Avaliação da atividade da enzima citocromo c oxidase (Cox) no grupo experimental e controle considerando os artigos incluídos na metanálise que utilizaram o método da espectrofotometria, considerando apenas o humano

A metanálise foi realizada com 13 estudos, comparando a atividade da enzima citocromo c oxidase no grupo afetado e não afetado (controle).

A figura 12 refere-se ao gráfico que incluiu na metanálise todos os artigos que preencheram os critérios de inclusão e que utilizaram o método da espectrofotometria, considerando apenas o humano. A estimativa da diferença global entre os grupos foi negativa, indicando diminuição na atividade da enzima no grupo afetado pela doença de Alzheimer. Entretanto, essa diferença não é estatisticamente significativa ($Z = 1,47$; $p\text{-valor} = 0,17$). Ou seja, não é possível rejeitar a hipótese nula de que a diferença entre os grupos é inexistente. A hipótese de homogeneidade entre os estudos foi rejeitada ($\text{Chi}^2 = 96,77$; $p\text{-valor} < 0,00001$). O valor $I^2 = 88\%$ indica que 88% da variação observada se deve à heterogeneidade entre os estudos.

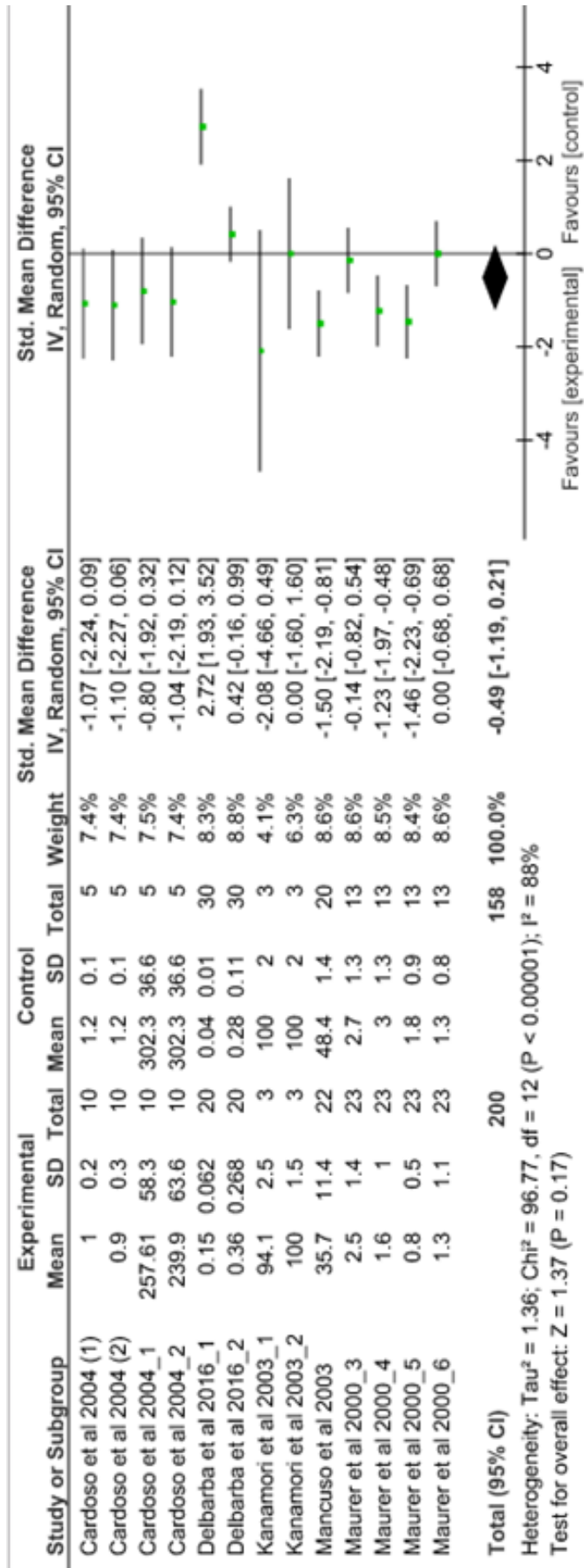


Figura 12- Avaliação da atividade de Cox no grupo experimental e controle. Metanálise realizada com 13 estudos. Gráfico incluindo todos os artigos na metanálise que utilizaram o método da espectrofotometria, considerando apenas o humano.

5.6- Avaliação da atividade da enzima citocromo c oxidase (Cox) no grupo experimental e controle considerando os artigos incluídos na metanálise que utilizaram o método da colorimetria, considerando apenas o modelo animal

A metanálise foi realizada com 10 estudos, comparando a atividade da enzima citocromo c oxidase no grupo afetado e não afetado (controle).

A figura 13 refere-se ao gráfico que incluiu todos os artigos na metanálise que preencheram os critérios de inclusão e que utilizaram o método da colorimetria, considerando apenas o modelo animal. A estimativa da diferença global entre os grupos foi negativa, indicando diminuição na atividade da enzima no grupo afetado pela doença de Alzheimer. Essa diferença é estatisticamente significativa ($Z= 5,31$; $p\text{-valor} < 0,00001$). Neste grupo, a homogeneidade entre os estudos foi confirmada ($\text{Chi}^2= 8,93$; $p\text{-valor} = 0,44$). Neste caso, o uso de um modelo de efeitos fixos seria equivalente ao utilizado (efeitos aleatórios).

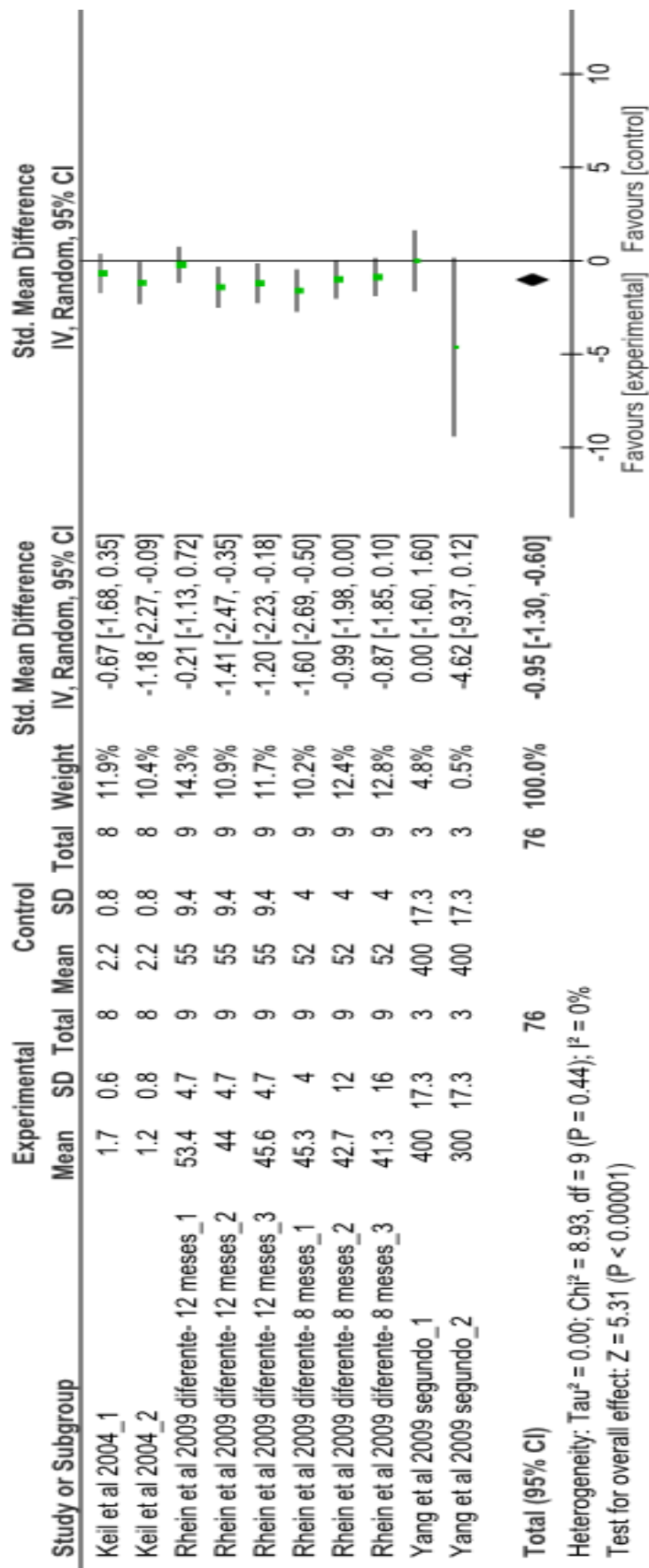


Figura 13- Avaliação da atividade de Cox no grupo experimental e controle. Metanálise realizada com 10 estudos. Gráfico incluindo todos os artigos na metanálise que utilizaram o método da colorimetria, considerando apenas o modelo animal.

6. Discussão

Nos gráficos de floresta, houve 35 estudos no total (comparações entre grupos afetados e não afetados pela doença de Alzheimer), distribuídos em 23 artigos (vide anexos). Desses 23, 15 utilizaram modelo animal e 8 utilizaram humanos para a pesquisa.

No gráfico que incluiu todos os artigos na metanálise que utilizaram os métodos da espectrofotometria, colorimetria e polarografia, modelo animal, todos mostraram diminuição na atividade da enzima no grupo afetado, exceto nos estudos do Aleari et al 2005 (1), Aleari et al 2005 (5), Lahmy et al 2015_2 e Lahmy et al 2015_3, que mostraram aumento na atividade de Cox no grupo afetado (estudos à direita da linha de nulidade) e os estudos Hou et al 2008_2 e Yang et al 2009 (segundo)_1, que mostraram que não houve diferença na atividade da enzima entre os grupos.

No gráfico que incluiu todos os artigos na metanálise que utilizaram os métodos da espectrofotometria, colorimetria e polarografia, humano, todos mostraram diminuição na atividade da enzima no grupo afetado exceto Delbarba et al 2016_1 e Delbarba et al 2016_2, que mostraram aumento na atividade de Cox no grupo afetado e os estudos Kanamori et al 2003_2 e Maurer et al 2000_6, que mostraram que não houve diferença na atividade da enzima entre os grupos.

O gráfico de floresta que incluiu os artigos referentes à polarografia, modelo animal, todos mostraram diminuição na atividade da enzima no grupo afetado, exceto nos estudos do Aleari et al 2005 (1) e Aleari et al 2005_1, que mostraram aumento na atividade da Cox no grupo afetado.

No gráfico que incluiu os artigos referentes à espectrofotometria, modelo animal, todos mostraram diminuição na atividade da enzima no grupo afetado exceto Lahmy et al 2015_2 e Lahmy et al 2015_3, que mostraram aumento na atividade de Cox no grupo afetado.

O gráfico de floresta que incluiu os artigos referentes à espectrofotometria, humano, todos mostraram diminuição na atividade da enzima no grupo afetado exceto Delbarba et al 2016_1 e Delbarba et al 2016_2, que mostraram aumento na atividade de Cox no grupo afetado e os estudos Kanamori et al 2003_2 e Maurer et al 2000_6, que mostraram que não houve diferença na atividade da enzima entre os grupos.

No gráfico que incluiu os artigos referentes à colorimetria, modelo animal, todos mostraram diminuição na atividade da enzima no grupo afetado exceto Yang et al 2009 segundo_1, que mostrou que não houve diferença na atividade da enzima entre os grupos.

Combinando esses dados dos artigos citados acima para cada gráfico de floresta, temos a medida resumo ou efeito global, que sugere que há diminuição na atividade da enzima citocromo c oxidase no grupo afetado pela DA em todos os métodos de quantificação da Cox (espectrofotometria, colorimetria e polarografia) no modelo animal. No humano, houve a diminuição da Cox na metanálise com os métodos agrupados e essa diminuição não foi significativa na metanálise referente ao método da espectrofotometria isolado.

Na metanálise envolvendo humanos, a retirada de três estudos fez com que a diferença entre os grupos, que era estatisticamente significativa, passasse a não ser mais no método isolado.

O prejudicado metabolismo energético mitocondrial, como atividade diminuída da citocromo c oxidase, está presente nos pacientes com AD esporádico. Alterações na função mitocondrial foram confirmadas no processo de envelhecimento humano e, também, em doenças como o Alzheimer, com efeitos na enzima Cox (BEAL, 1995). Esta, nos pacientes com AD esporádico, mostra baixa expressão e/ou insuficiente número de subunidades do complexo (PARKER et al., 1994; MAURER et al., 2000). No estudo de Delbarba et al. (2016), a diminuição na expressão da enzima foi correlacionada com o declínio cognitivo, característico de pacientes com Alzheimer, medido pelo teste MMSE.

A enzima Cox tem um papel chave na inibição da respiração celular. Sua diminuição, em estudo realizado por Avetisyan et al. (2016), foi proporcional à inibição de outra enzima mitocondrial, como a NADH oxidase. A inibição de Cox pode ser causada pelo peptídeo A β acumulado mitocondrialmente (CROUCH et al., 2005; PEDROS et al., 2014), resultando na disfunção da cadeia de transporte de elétrons, ativando a amiloidogênese e peroxidação lipídica (HERNANDEZ-ZIMBRON et al, 2015; JIAO et al., 2012).

A atividade da Cox foi diminuída pelo peptídeo A β no cérebro e outros tecidos de pacientes com Alzheimer. Essa diminuição causou expressiva redução na energia celular, causando a deposição de A β e fosforilação da proteína tau. Esses dados sugerem que o dano mitocondrial pode ter um papel

na neurodegeneração e na deposição do peptídeo beta-amilóide (KALRA et al., 2016).

O estudo mostrou que o oligômero de A β 1-42 alterou significativamente a atividade de complexos da cadeia respiratória mitocondrial, como da Cox, prejudicando a viabilidade das células neurais cerebrais desses animais, comparados aos controles sham (KALRA et al., 2016). Canevari et al. (1999) demonstraram que a redução na atividade dessa enzima pelos peptídeos A β pode ser devido a uma interação direta entre esses e as subunidades enzimáticas (CROUCH et al., 2006), como também à indução do estresse oxidativo.

Outros estudos mostraram que a atividade da enzima Cox diminuiu em 25 a 30%, conforme análise pós-morte em várias regiões do córtex cerebral de pessoas com Alzheimer e nas plaquetas desses indivíduos (MUTISAYA; BOWLING; BEAL, 1994).

Outros autores mostraram, utilizando métodos histoquímicos, uma diminuição na atividade da enzima em algumas regiões do cérebro como as regiões CA1, CA3 e CA4 do hipocampo, que são afetadas na doença de Alzheimer e o giro denteado (SIMONIAN; HYMAN, 1993). Outro estudo demonstra que no cérebro de pessoas com a doença de Alzheimer, foi observada uma redução acentuada na atividade do complexo IV (enzima Cox) da cadeia respiratória mitocondrial, através da análise das atividades dos complexos dessa cadeia (MAURER; ZIERZ; MOLLER, 2000). Outros trabalhos mostram que houve diminuição da enzima no córtex frontoparietal de macacos rhesus. A enzima pode estar vulnerável a diminuição na sua atividade, sendo dependente da idade. Essa redução na função mitocondrial dependente da idade poderia estar relacionada ao início tardio e diminuições dependentes da idade na incidência de várias doenças afetando o cérebro, como o Alzheimer (BOWLING et al., 1993).

Considerando o modelo animal de Alzheimer, Greilberger et al. (2008), em estudo realizado com camundongos OBX (submetidos a bulbectomia olfativa), constataram que as mitocôndrias desses animais apresentaram disfunções na cadeia transportadora de elétrons, que foram acompanhadas por aumento da peroxidação lipídica. Essa peroxidação compromete a homeostase lipídica de células da mitocôndria e das membranas, mudando propriedades e

estruturas membranares, o que leva ao prejuízo de sua função e acarreta apoptose celular.

Avetisyan et al. (2016) demonstraram pela primeira vez que a neurodegeneração tipo DA em camundongos OBX está acompanhada por comprometimento mitocondrial no neocórtex e hipocampo. Nas frações mitocondriais dessas regiões, a citocromo c oxidase mostrou diminuída atividade, inibindo a cadeia respiratória, típico em tecidos cerebrais de pacientes com a doença.

O modelo animal dos camundongos OBX é importante, válido para o estudo do Alzheimer esporádico. Ainda em relação ao mecanismo de neurodegeneração nesses animais, ele é sugerido por: acumulação de A β na matriz e membrana de acoplamento, prejudicando a membrana mitocondrial e a cadeia respiratória e sugerido também por disfunções mitocondriais, gerando espécies reativas de oxigênio (ERO) e estresse oxidativo, ocasionando apoptose e consequente morte neuronal (AVETISYAN et al., 2016).

O aumento de ERO e as disfunções mitocondriais desencadeiam a produção de A β , resultando em um ciclo vicioso de acumulação do peptídeo e comprometimento mitocondrial, que leva à neurodegeneração (RETTBERG et al., 2014; SWERDLOW et al., 2010; YAO et al., 2011). A superprodução de ERO induz a peroxidação lipídica membranar, podendo alterar as subunidades da Cox e prejudicar a atividade da enzima (PARADIES et al., 1998; BOBBA et al., 2013). No hipocampo do rato, região afetada pelo Alzheimer, encontrou-se um acentuado aumento no estresse oxidativo (MEUNIER et al., 2006).

Para a realização da revisão sistemática e metanálise, tivemos algumas dificuldades como: falta de dados de alguns artigos, os autores não responderam as dúvidas dos e-mails referentes aos dados que faltavam dos artigos e alguns artigos não foram encontrados. Sendo assim, esses estudos tiveram que ser excluídos.

A diversidade dos artigos, das unidades de medida, dos métodos de quantificação da atividade da Cox bem como dos desfechos observados nos estudos, fez com que a heterogeneidade entre eles ficasse elevada. Sendo assim, neste trabalho a prioridade está concentrada na direção da diferença entre os grupos de afetados e não afetados, ou seja, na diminuição, ou não, da atividade da Cox e não exatamente no tamanho dessa diminuição.

Nas metanálises realizadas observa-se que a atividade da Cox foi diminuída no modelo animal de Alzheimer, em todos os métodos de quantificação e no humano, foi diminuída nos métodos agrupados e não foi estatisticamente significativo no método isolado, mostrando a importância dessa enzima como um possível novo biomarcador para a doença. A Cox pode ser também um possível alvo de tratamento, sendo muito relevante, uma vez que até o momento, não há tratamentos eficazes para a doença na sua prevenção ou reversão, embora tenham ocorridos importantes progressos na elucidação de sua patogênese (FANG et al., 2016). Experimentos com animais e modelos celulares da doença demonstraram a redução da morte neuronal através da proteção mitocondrial (DU et al, 2008). Outra importância da enzima é ser utilizada como mais um método de diagnóstico complementar.

Concluimos que a Cox pode representar um componente importante nos mecanismos moleculares subjacentes à D.A.. O nosso estudo pode servir como norte, como direcionamento para futuros trabalhos, áreas básica ou clínica, voltados ao tratamento e/ou diagnóstico da doença de Alzheimer. Essa enzima parece ser uma enzima chave relacionada a essa doença neurodegenerativa, sua disfunção está relacionada a apoptose e consequente morte dos neurônios.

Referências bibliográficas

ANTHONY, G. et al. Different isozymes of cytochrome c oxidase are expressed in bovine smooth muscle and skeletal or heart muscle. **FEBS Lett**, v. 277, n. 1-2, p. 97-100, Dec 1990. ISSN 0014-5793. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2176624>>.

ATALLAH, A.N.; CASTRO, A.A.. Revisão Sistemática e Metanálises, em: Evidências para melhores decisões clínicas. São Paulo. Lemos Editorial, 1998.

AVETISYAN, A. V. et al. Mitochondrial Dysfunction in Neocortex and Hippocampus of Olfactory Bulbectomized Mice, a Model of Alzheimer's Disease. **Biochemistry (Mosc)**, v. 81, n. 6, p. 615-23, Jun 2016. ISSN 1608-3040. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27301290>>.

BARTEN, D. M.; ALBRIGHT, C. F. Therapeutic strategies for Alzheimer's disease. **Mol Neurobiol**, v. 37, n. 2-3, p. 171-86, 2008 Apr-Jun 2008. ISSN 0893-7648. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18581273>>.

BEAL, M. F. Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Ann Neurol**, v. 38, n. 3, p. 357-66, Sep 1995. ISSN 0364-5134. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7668820>>.

BOBBA, A. et al. Mitochondrial respiratory chain Complexes I and IV are impaired by β -amyloid via direct interaction and through Complex I-dependent ROS production, respectively. **Mitochondrion**, v. 13, n. 4, p. 298-311, Jul 2013. ISSN 1872-8278. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23562762>>.

BORENSTEIN, M. et al. Introduction to Meta-Analysis, **John Wiley & Sons**, 2009.

BOWLING, A. C. et al. Age-dependent impairment of mitochondrial function in primate brain. **J Neurochem**, v. 60, n. 5, p. 1964-7, May 1993. ISSN 0022-3042. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8473911>>.

CANEVARI, L.; CLARK, J. B.; BATES, T. E. beta-Amyloid fragment 25-35 selectively decreases complex IV activity in isolated mitochondria. **FEBS Lett**, v. 457, n. 1, p. 131-4, Aug 1999. ISSN 0014-5793. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10486579>>.

CAVALLUCCI, V.; FERRAINA, C.; D'AMELIO, M. Key role of mitochondria in Alzheimer's disease synaptic dysfunction. **Curr Pharm Des**, v. 19, n. 36, p. 6440-50, 2013. ISSN 1873-4286. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23432718>>.

COCHRANE HANDBOOK FOR SYSTEMATIC REVIEWS OF INTERVENTIONS, 2011. Disponível em: <<http://handbook-5-1.cochrane.org>>.

CREWS, L.; MASLIAH, E. Molecular mechanisms of neurodegeneration in

Alzheimer's disease. **Hum Mol Genet**, v. 19, n. R1, p. R12-20, Apr 2010. ISSN 1460-2083. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20413653>>.

CROUCH, P. J. et al. Copper-dependent inhibition of cytochrome c oxidase by Abeta(1-42) requires reduced methionine at residue 35 of the Abeta peptide. **J Neurochem**, v. 99, n. 1, p. 226-36, Oct 2006. ISSN 0022-3042. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16987248>>.

CROUCH, P. J. et al. Copper-dependent inhibition of human cytochrome c oxidase by a dimeric conformer of amyloid-beta1-42. **J Neurosci**, v. 25, n. 3, p. 672-9, Jan 2005a. ISSN 1529-2401. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15659604>>.

DE STROOPER, B.; VASSAR, R.; GOLDE, T. The secretases: enzymes with therapeutic potential in Alzheimer disease. **Nat Rev Neurol**, v. 6, n. 2, p. 99-107, Feb 2010. ISSN 1759-4766. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20139999>>.

DELBARBA, A. et al. Mitochondrial Alterations in Peripheral Mononuclear Blood Cells from Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment Patients. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2016, p. 5923938, 2016. ISSN 1942-0994. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26881032>>.

DIAZ, F. et al. Cytochrome c oxidase is required for the assembly/stability of respiratory complex I in mouse fibroblasts. **Mol Cell Biol**, v. 26, n. 13, p. 4872-81, Jul 2006. ISSN 0270-7306. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16782876>>.

DU, H. et al. Cyclophilin D deficiency attenuates mitochondrial and neuronal perturbation and ameliorates learning and memory in Alzheimer's disease. **Nat Med**, v. 14, n. 10, p. 1097-105, Oct 2008. ISSN 1546-170X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18806802>>.

ENDNOTE. Versão virtual, 2017. Disponível em: <<http://endnote.com/product-details/basic>>

ESTRUTURA DA ENZIMA CITOCROMO C OXIDASE MITOCONDRIAL. **Fosforilação oxidativa.** Disponível em: <https://www.google.com.br/search?q=citocromo+c+oxidase&client=firefox-b-ab&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwi73OvB3d3RAhWGS5AKHTJ6B-gQ_AUICCGB&biw=1366&bih=657#imgrc=0aZXNF2HqLhyrM>. Acesso em: 10 de jan. 2018.

FANG, D. et al. Increased Electron Paramagnetic Resonance Signal Correlates with Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in an Alzheimer's disease Mouse Brain. **J Alzheimers Dis**, v. 51, n. 2, p. 571-80, 2016. ISSN 1875-8908. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26890765>>.

FORMAÇÃO DOS EMARANHADOS NEUROFIBRILARES. **Wikipédia**. Disponível em: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/51/TANGLES_HIGH.jpg. Acesso em: 6 de jan. 2018.

FREITAS, et al. **Tratado de geriatria e gerontologia**, 2013.

GATZ, M. et al. Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. **Arch Gen Psychiatry**, v. 63, n. 2, p. 168-74, Feb 2006. ISSN 0003-990X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16461860>>.

GIBSON, G. E.; SHEU, K. F.; BLASS, J. P. Abnormalities of mitochondrial enzymes in Alzheimer disease. **J Neural Transm (Vienna)**, v. 105, n. 8-9, p. 855-70, 1998. ISSN 0300-9564. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9869323>>.

GREILBERGER, J. et al. Malondialdehyde, carbonyl proteins and albumin-disulphide as useful oxidative markers in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. **Free Radic Res**, v. 42, n. 7, p. 633-8, Jul 2008. ISSN 1029-2470. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18654878>>.

HERNÁNDEZ-ZIMBRÓN, L. F.; RIVAS-ARANCIBIA, S. Oxidative stress caused by ozone exposure induces β -amyloid 1-42 overproduction and mitochondrial accumulation by activating the amyloidogenic pathway. **Neuroscience**, v. 304, p. 340-8, Sep 2015. ISSN 1873-7544. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26197225>>.

HIGGINS, J. P; THOMPSON, S. G.. How should meta-regression analyses be undertaken and interpreted? **Stat Med**, v. 21, n. 11, p. 1559-73, Jun 2002. ISSN 0277-6715. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12111920>>.

HÜTTEMANN, M.; FRANK, V.; KADENBACH, B. The possible role of isoforms of cytochrome c oxidase subunit VIa in mammalian thermogenesis. **Cell Mol Life Sci**, v. 55, n. 11, p. 1482-90, Aug 1999. ISSN 1420-682X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10518994>>.

JIAO, Y. et al. Direct observation of internalization and ROS generation of amyloid β -peptide in neuronal cells at subcellular resolution. **ChemBiochem**, v. 13, n. 16, p. 2335-8, Nov 2012. ISSN 1439-7633. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23060092>>.

KADENBACH, B.; HÜTTEMANN, M. The subunit composition and function of mammalian cytochrome c oxidase. **Mitochondrion**, v. 24, p. 64-76, Sep 2015. ISSN 1872-8278. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26190566>>.

KALRA, J. et al. Modulation of LOX and COX pathways via inhibition of amyloidogenesis contributes to mitoprotection against β -amyloid oligomer-induced toxicity in an animal model of Alzheimer's disease in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 146-147, p. 1-12, 2016 Jul-Aug 2016. ISSN 1873-5177.

Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27106205>>.

KOLAROVA, M. et al. Structure and pathology of tau protein in Alzheimer disease. **Int J Alzheimers Dis**, v. 2012, p. 731526, 2012. ISSN 2090-0252. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22690349>>.

LAGE, J.M.M. **Factores de riesgo y de protección de enfermedad de Alzheimer**. Capítulo 2, 33-67, 2002.

LIGHTOWLERS, R. et al. Isolation and characterization of the cDNAs encoding two isoforms of subunit CIX of bovine cytochrome c oxidase. **J Biol Chem**, v. 265, n. 5, p. 2677-81, Feb 1990. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1689292>>.

LINDER, D.; FREUND, R.; KADENBACH, B. Species-specific expression of cytochrome c oxidase isozymes. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v. 112, n. 3, p. 461-9, Nov 1995. ISSN 1096-4959. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8529022>>.

MALMSTRÖM, B. G. Cytochrome oxidase: some unsolved problems and controversial issues. **Arch Biochem Biophys**, v. 280, n. 2, p. 233-41, Aug 1990. ISSN 0003-9861. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2164353>>.

MANUAL DIAGNÓSTICO E ESTATÍSTICO DE TRANSTORNOS MENTAIS. **Associação Americana de Psiquiatria**, 1994.

MAURER, I.; ZIERZ, S.; MÖLLER, H. J. A selective defect of cytochrome c oxidase is present in brain of Alzheimer disease patients. **Neurobiol Aging**, v. 21, n. 3, p. 455-62, 2000 May-Jun 2000a. ISSN 0197-4580. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10858595>>.

MEUNIER, J.; IENI, J.; MAURICE, T. The anti-amnesic and neuroprotective effects of donepezil against amyloid beta₂₅₋₃₅ peptide-induced toxicity in mice involve an interaction with the sigma₁ receptor. **Br J Pharmacol**, v. 149, n. 8, p. 998-1012, Dec 2006. ISSN 0007-1188. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17057756>>.

MOURA, D.S. et al. **Bioquímica, roteiro de aulas práticas**, 2015.

MUTISYA, E. M.; BOWLING, A. C.; BEAL, M. F. Cortical cytochrome oxidase activity is reduced in Alzheimer's disease. **J Neurochem**, v. 63, n. 6, p. 2179-84, Dec 1994. ISSN 0022-3042. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7964738>>.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Dementia. **Factsheet** 362:3, 2017.

PALOP, J. J.; MUCKE, L. Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. **Nat Neurosci**, v. 13, n. 7, p. 812-8, Jul 2010. ISSN 1546-1726. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20581818>>.

PARADIES, G. et al. Age-dependent decrease in the cytochrome c oxidase activity and changes in phospholipids in rat-heart mitochondria. **Arch Gerontol Geriatr**, v. 16, n. 3, p. 263-72, 1993 May-Jun 1993. ISSN 0167-4943. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15374339>>.

PARADIES, G. et al. Peroxidative damage to cardiac mitochondria: cytochrome oxidase and cardiolipin alterations. **FEBS Lett**, v. 424, n. 3, p. 155-8, Mar 1998. ISSN 0014-5793. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9539141>>.

PARKER, W. D. et al. Electron transport chain defects in Alzheimer's disease brain. **Neurology**, v. 44, n. 6, p. 1090-6, Jun 1994. ISSN 0028-3878. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8208407>>.

PEARSON, K. Report on Certain Enteric Fever Inoculation Statistics. **Br Med J**, v. 2, n. 2288, p. 1243-6, Nov 1904. ISSN 0007-1447. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20761760>>.

PEDRÓS, I. et al. Early alterations in energy metabolism in the hippocampus of APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer's disease. **Biochim Biophys Acta**, v. 1842, n. 9, p. 1556-66, Sep 2014a. ISSN 0006-3002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24887203>>.

PIERRON, D. et al. Cytochrome c oxidase: evolution of control via nuclear subunit addition. **Biochim Biophys Acta**, v. 1817, n. 4, p. 590-7, Apr 2012. ISSN 0006-3002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21802404>>.

PIOMBONI, P. et al. The role of mitochondria in energy production for human sperm motility. **Int J Androl**, v. 35, n. 2, p. 109-24, Apr 2012. ISSN 1365-2605. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21950496>>.

PLACAS SENIS E EMARANHADOS NEUROFIBRILARES NOS EXAMES HISTOPATOLÓGICOS. **Plaques and tangles**. Hoze Knows, 2013. Disponível em: <http://hozeknows.co.uk/2013/12/09/plaques-tangles>. Acesso em: 5 jan. 2018.

RAK, M. et al. Mitochondrial cytochrome c oxidase deficiency. **Clin Sci (Lond)**, v. 130, n. 6, p. 393-407, Mar 2016. ISSN 1470-8736. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26846578>>.

READNOWER, R. D.; SAUERBECK, A. D.; SULLIVAN, P. G. Mitochondria, Amyloid β , and Alzheimer's Disease. **Int J Alzheimers Dis**, v. 2011, p. 104545, Mar 2011. ISSN 2090-0252. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21547208>>.

RETTBERG, J. R.; YAO, J.; BRINTON, R. D. Estrogen: a master regulator of bioenergetic systems in the brain and body. **Front Neuroendocrinol**, v. 35, n.

1, p. 8-30, Jan 2014. ISSN 1095-6808. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23994581>>.

REVMAN. Versão 5.3, 2011. Disponível em: <<http://tech.cochrane.org/revman>>

RODRIGUES, C.L. ; ZIEGELMANN, P.K. **Metanálise: um guia prático**, 2010.

ROSS, S.D. et al. Systematic review of the literature regarding the diagnosis of sleep apnea. Rockville MD: **Agency for HealthCare Policy and Research**, 1999.

SAADA, A. et al. Combined OXPHOS complex I and IV defect, due to mutated complex I assembly factor C20ORF7. **J Inherit Metab Dis**, v. 35, n. 1, p. 125-31, Jan 2012. ISSN 1573-2665. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21607760>>.

SANTOS, M.C. **Polarografia e métodos polarográficos**, 1994.

SCHLERF, A. et al. Characterization of two different genes (cDNA) for cytochrome c oxidase subunit VIa from heart and liver of the rat. **EMBO J**, v. 7, n. 8, p. 2387-91, Aug 1988. ISSN 0261-4189. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2461293>>.

SEELAN, R. S.; GROSSMAN, L. I. Cytochrome c oxidase subunit VIIa isoforms. Characterization and expression of bovine cDNAs. **J Biol Chem**, v. 266, n. 29, p. 19752-7, Oct 1991. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1717471>>.

SIMONIAN, N. A.; HYMAN, B. T. Functional alterations in Alzheimer's disease: diminution of cytochrome oxidase in the hippocampal formation. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 52, n. 6, p. 580-5, Nov 1993. ISSN 0022-3069. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8229076>>.

SOHAL, R. S. Aging, cytochrome oxidase activity, and hydrogen peroxide release by mitochondria. **Free Radic Biol Med**, v. 14, n. 6, p. 583-8, Jun 1993. ISSN 0891-5849. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8392019>>.

SRINIVASAN, S.; AVADHANI, N. G. Cytochrome c oxidase dysfunction in oxidative stress. **Free Radic Biol Med**, v. 53, n. 6, p. 1252-63, Sep 2012. ISSN 1873-4596. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22841758>>.

STRUBLE, R. G. et al. Apolipoprotein E may be a critical factor in hormone therapy neuroprotection. **Front Biosci**, v. 13, p. 5387-405, May 2008. ISSN 1093-9946. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18508594>>.

SWERDLOW, R. H.; BURNS, J. M.; KHAN, S. M. The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis. **J Alzheimers Dis**, v. 20 Suppl 2, p. S265-79, 2010. ISSN 1875-8908. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20442494>>.

TSUKIHARA, T. et al. The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. **Science**, v. 272, n. 5265, p. 1136-44, May 1996. ISSN 0036-8075. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8638158>>.

VAS, C.J. et al. Alzheimer's Disease: The Brain Killer, 1. World Health Organization, 2001.

WARBURG, O; NEGELEIN, E. **Biochem. Z.**, 214,64, 1929.

WHITEHEAD, A. Meta-analysis of controlled clinical trials. **John Wiley & Sons**. 2002.

YANAMURA, W. et al. Tissue-specific differences between heart and liver cytochrome c oxidase. **Biochemistry**, v. 27, n. 13, p. 4909-14, Jun 1988. ISSN 0006-2960. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2844245>>.

YAO, J. et al. Shift in brain metabolism in late onset Alzheimer's disease: implications for biomarkers and therapeutic interventions. **Mol Aspects Med**, v. 32, n. 4-6, p. 247-57, Aug 2011. ISSN 1872-9452. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22024249>>.

Anexos

Espectrofotometria, colorimetria e polarografia, modelo animal

Estudo	Tipo de célula amostrada	Resultado do estudo	Humano ou modelo animal
Aleardi et al 2005 (1)	Neurônio	Aumento na atividade da enzima no grupo afetado	Modelo animal
Aleardi et al 2005 (5)	Neurônio	Aumento na atividade da enzima no grupo afetado	Modelo animal
Lahmy et al 2015_2	Neurônio	Aumento na atividade da enzima no grupo afetado	Modelo animal
Lahmy et al 2015_3	Neurônio	Aumento na atividade da enzima no grupo afetado	Modelo animal
Hou et al 2008_2	Neurônio	Não houve diferença na atividade entre os grupos	Modelo animal
Yang et al 2009 (segundo)_1	Neurônio	Não houve diferença na atividade entre os grupos	Modelo animal
Restante dos estudos	Neurônio	Diminuição na atividade da enzima no grupo afetado	Modelo animal

Espectrofotometria, colorimetria e polarografia, humano

Estudo	Tipo de célula amostrada	Resultado do estudo	Humano ou modelo animal
Delbarba et al 2016_1	Neurônio	Aumento na atividade da enzima no grupo afetado	Humano
Delbarba et al 2016_2	Neurônio	Aumento na atividade da enzima no grupo afetado	Humano
Kanamori et al 2003_2	Neurônio	Não houve diferença na atividade entre os grupos	Humano
Maurer et al 2000_6	Neurônio	Não houve diferença na atividade entre os grupos	Humano
Restante dos estudos	Neurônio	Diminuição na atividade da enzima no grupo afetado	Humano

Polarografia, modelo animal

Estudo	Tipo de célula amostrada	Resultado do estudo	Humano ou modelo animal
Aleardi et al 2005 (1)	Neurônio	Aumento na atividade da enzima no grupo afetado	Modelo animal
Aleardi et al 2005_1	Neurônio	Aumento na atividade da enzima no grupo afetado	Modelo animal
Restante dos estudos	Neurônio	Diminuição na atividade da enzima no grupo afetado	Modelo animal

Espectrofotometria, modelo animal

Estudo	Tipo de célula amostrada	Resultado do estudo	Humano ou modelo animal
Lahmy et al 2015_2	Neurônio	Aumento na atividade da enzima no grupo afetado	Modelo animal
Lahmy et al 2015_3	Neurônio	Aumento na atividade da enzima no grupo afetado	Modelo animal

Restante dos estudos	Neurônio	Diminuição na atividade da enzima no grupo afetado	Modelo animal
----------------------	----------	--	---------------

Espectrofotometria, humano

Estudo	Tipo de célula amostrada	Resultado do estudo	Humano ou modelo animal
Delbarba et al 2016_1	Neurônio	Aumento na atividade da enzima no grupo afetado	Humano
Delbarba et al 2016_2	Neurônio	Aumento na atividade da enzima no grupo afetado	Humano
Kanamori et al 2003_2	Neurônio	Não houve diferença na atividade entre os grupos	Humano
Maurer et al 2000_6	Neurônio	Não houve diferença na atividade entre os grupos	Humano
Restante dos estudos	Neurônio	Diminuição na atividade da enzima no grupo afetado	Humano

Colorimetria, modelo animal

Estudo	Tipo de célula amostrada	Resultado do estudo	Humano ou modelo animal
Yang et al 2009 segundo_1	Neurônio	Não houve diferença na atividade entre os grupos	Modelo animal
Restante dos estudos	Neurônio	Diminuição na atividade da enzima no grupo afetado	Modelo animal

Estudo	Resultado do estudo
Avetysian et al 2016_1	Diminuição considerável na atividade de Cox na mitocôndria neocortical de camundongos OBX comparados ao sham (controle), similar aos dados obtidos com outros modelos animais de AD
Avetysian et al 2016_2	Diminuição considerável na atividade de Cox na mitocôndria hipocampal de camundongos OBX comparados ao sham (controle), similar aos dados obtidos com outros modelos animais de AD
Fang et al 2016	Comparado aos camundongos não transgênicos, os camundongos mAPP mostraram uma redução significativa na atividade da enzima no córtex
Hu et al 2016	A redução de aproximadamente 20% da enzima foi detectada nos neurônios tratados com AB em comparação ao grupo veículo
Kalra et al 2016	A administração ICV de oligômero AB significativamente prejudicou a atividade de Cox quando comparado com o sham
Kaur et al 2015	A atividade da enzima foi encontrado em ser reduzido significativamente por 59% na presença de respostas ao estresse induzidas por AB25-35 nas células SH-SY5Y. Uma similar tendência de redução de 57% da atividade do complexo IV foi também vista nas células IMR-32.
Lahmy et al 2015_1	A atividade da enzima diminuiu significativamente por 14% no grupo AB25-35 comparado ao controle Sc.AB
Lahmy et al 2015_2	A liberação de Cox no grupo veículo AB25-35 aumentou em comparação ao veículo Sc.AB

Lahmy et al 2015_3	A liberação de Cox no grupo veículo AB25-35 aumentou em comparação ao veículo Sc.AB
Yang et al 2009 (segundo)_1	Não houve diminuição da atividade de COX
Yang et al 2009 (segundo)_2	Diminuição da atividade de COX
Walls 2012	Diminuição da atividade do complexo IV na mitocôndria
Keil et al 2004_1	As células APPswPC12 mostraram uma redução significativa na atividade da COX comparadas com as células APPwt e controle PC12
Keil et al 2004_2	As células APPswPC12 mostraram uma redução significativa na atividade da COX comparadas com as células APPwt e controle PC12
Rhein et al 2009	A relação do complexo IV/CS foi significativamente diminuída nas células APP comparada às células controle
Rhein et al 2010	A atividade de COX foi diminuída nas células APP comparadas às células controles
Cassano et al 2012_1	Diminuição da atividade respiratória de COX em camundongos transgênicos para o Alzheimer comparados aos controles no córtex frontal
Cassano et al 2012_2	Diminuição da atividade respiratória de COX em camundongos transgênicos para o Alzheimer comparados aos controles no hipocampo
Cassano et al 2012_3	Diminuição da atividade enzimática de COX em camundongos transgênicos para o Alzheimer comparados aos controles no córtex frontal
Cassano et al 2012_4	Diminuição da atividade enzimática de COX em camundongos transgênicos para o Alzheimer comparados aos controles no hipocampo
Kanamori et al 2003_1	Não houve diferença na atividade entre os grupos
Kanamori et al 2003_2	Não houve diferença na atividade entre os grupos
Seo et al 2011	A atividade de COX nos camundongos transgênicos foi muito reduzida comparada aos controles não transgênicos
Rhein et al 2009 diferente- 8 meses_1	Não houve diferença em relação ao controle
Rhein et al 2009 diferente- 8 meses_2	A atividade da COX foi diminuída em relação ao controle
Rhein et al 2009 diferente- 8 meses_3	A atividade da COX foi diminuída em relação ao controle
Rhein et al 2009 diferente-12 meses	Não houve diferença em relação ao controle
Rhein et al 2009 diferente-12 meses	A atividade da COX foi diminuída em relação ao controle e pR5 (a diminuição foi maior em comparação aos 8 meses)

Rhein et al 2009 diferente-12 meses	A atividade da COX foi diminuída em relação ao controle e pR5 (a diminuição foi maior em comparação aos 8 meses)
Maurer et al 2000_3	Não foi observado diferenças significativas na atividade de COX
Maurer et al 2000_4	A relação da atividade de COX para atividade de CS foi significativamente menor no córtex temporal de AD comparada aos controles saudáveis
Maurer et al 2000_5	A relação da atividade de COX para atividade de CS foi significativamente menor no hipocampo de AD comparada aos controles saudáveis
Maurer et al 2000_6	Não foi observado diferenças significativas na atividade de COX
Mancuso et al 2003	Os testes laboratoriais de rotina foram normais em todos os pacientes/A atividade da COX foi menor nos pacientes com Alzheimer
Cardoso et al 2004 (1)	Diferente significativamente do controle
Cardoso et al 2004 (2)	Diferente significativamente do controle
Cardoso et al 2004_1	Diferente significativamente do controle
Cardoso et al 2004_2	Diferente significativamente do controle
Delbarba et al 2016_1	Grupo com Alzheimer mostrou um leve, mas estatisticamente significante, aumento na atividade de Cox
Delbarba et al 2016_2	A relação Cox/citrato sintase foi aumentada nesses pacientes, quando comparados com os controles
Zhao et al 2016	Os camundongos CSR mostraram significativamente menos níveis de Cox corticais frontais comparados com os camundongos controles
Guo et al 2011	Diminuição da atividade do complexo IV na mitocôndria
Hou et al 2008_1	Comparado com o grupo controle, o valor da absorbância foi significativamente menor no grupo modelo
Hou et al 2008_2	Comparado com o grupo modelo, o valor da absorbância foi significativamente maior no grupo tratamento
Aleardi et al 2005 (1)	Aumento na atividade da enzima no grupo afetado
Aleardi et al 2005 (2)	Diminuição na atividade da enzima no grupo afetado
Aleardi et al 2005 (5)	Aumento na atividade da enzima no grupo afetado
Aleardi et al 2005 1	Não houve diferença na atividade entre os grupos
Aleardi et al 2005 2	Não houve diferença na atividade entre os grupos
Aleardi et al 2005_1	Não houve diferença na atividade entre os grupos
Aleardi et al 2005_2	Não houve diferença na atividade entre os grupos