

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

BRUNA LUÍSA SCHALLENBERGER

**EFEITO DO ENVELHECIMENTO SOBRE O CONTEÚDO DE
SUPERÓXIDO DISMUTASE 1 EM EXOSSOMOS CIRCULANTES DE
RATOS WISTAR**

Porto Alegre
2016

BRUNA LUÍSA SCHALLENBERGER

**EFEITO DO ENVELHECIMENTO SOBRE O CONTEÚDO DE
SUPERÓXIDO DISMUTASE 1 EM EXOSSOMOS CIRCULANTES DE
RATOS WISTAR**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a. Dra. Ionara Rodrigues Siqueira.

Porto Alegre
2016

*“Que os vossos esforços desafiem as
impossibilidades, lembrai-vos de que as
grandes coisas do homem foram
conquistadas do que parecia impossível.”*

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família por toda crença, apoio, confiança, incentivo e paciência que sempre depositaram em mim. Especialmente, à minha mãe, que onde estiver sei que está ao meu lado!

Agradeço também a todos os meus amigos que sempre estiveram do meu lado, e especialmente àqueles que encontrei nesta jornada da graduação e que com certeza os levarei para o resto da vida.

Ao pessoal do laboratório de Neuropsicofarmacologia, que sempre estive disposto a me ensinar e ajudar de todas as maneiras possíveis. Não poderia ter encontrado colegas melhores!

Em especial, gostaria de agradecer a minha orientadora, Ionara. Por toda a sua compreensão e carinho em um dos momentos mais difíceis que passei. E claro, por toda a sua orientação.

Agradeço a Giana e a professora Adriane pela parceria e ajuda.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

Sumário

Resumo.....	5
Lista de figuras.....	6
Abreviaturas.....	7
Introdução.....	8
Justificativa.....	11
Objetivo.....	11
Materiais e Métodos.....	11
Resultados.....	14
Discussão.....	16
Considerações Finais.....	19
Referências Bibliográficas.....	20

Resumo: O envelhecimento é um processo caracterizado pelo declínio progressivo das funções fisiológicas, sendo um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. Atualmente, os exossomos estão sendo vistos como uma importante ferramenta para diagnóstico e prognóstico de doenças neurodegenerativas, já que apresentam um importante papel na comunicação celular e parecem estar relacionados ao desenvolvimento de diversas destas doenças. Recentemente, nosso grupo de pesquisa observou que o processo de envelhecimento impactou na atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em exossomos circulantes de ratos Wistar. Sendo assim, objetivo do trabalho foi avaliar os níveis da isoforma da enzima, SOD1, em exossomos circulantes de roedores no processo de envelhecimento. Foram utilizados ratos Wistar de diferentes idades; o sangue troncular foi utilizado para a extração de exossomos. Os resultados demonstram que não houve diferença no conteúdo exossomal de SOD1 entre animais adultos e envelhecidos.

Palavras-chave: envelhecimento, exossomos, superóxido dismutase 1.

Lista de Figuras

Figura 1. Biogênese dos exossomos a partir da membrana dos corpos multivesiculares e sua secreção para o espaço extracelular.....	9
Figura 2. Composição dos exossomos: proteínas específicas de membrana e intracelulares.....	10
Figura 3. Padronização de concentrações de proteínas totais em fração exossomal para determinação do conteúdo de superóxido dismutase 1 (SOD1).....	14
Figura 4. Conteúdo de SOD1 em exossomos circulantes de ratos de 3 e 26 meses de idade (n=4). (A) Intensidade da banda (área X OD) normalizada por Ponceau. (B) Western blotting.....	15
Figura 5. Ilustração de componentes mitocondriais em vesículas extracelulares.....	17

Lista de Abreviaturas

SOD	Superóxido Dismutase
ELA	Esclerose Lateral Amiotrófica
EV's	Vesículas Extracelulares
miRNA	MicroRNA
Aβ	peptídeo β -amiloide

1. Introdução

O avanço nas áreas da saúde e o acesso ao saneamento básico que vem ocorrendo ao longo das últimas décadas estão acarretando um aumento significativo na expectativa de vida da população (Lima-Costa e Veras, 2003; de Silva e Boemer, 2009). Segundo o relatório da Organização das Nações Unidas divulgado em 2011, até 2020 o número de pessoas com 65 anos ou mais irão superar o número de crianças menores de 5 anos (WHO, 2007). No Brasil, os dados mais atualizados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística indicam que as pessoas com idade igual ou superior aos 60 anos correspondem a 11,8% da população total. Ainda, em relação ao Rio Grande do Sul, estado brasileiro com o maior número de indivíduos acima de 60 anos, 13,6% da população total é considerada idosa (Censo 2010, IBGE).

O envelhecimento é um processo caracterizado pelo declínio progressivo das funções fisiológicas (Deleidi et al., 2015; Miniciullo et al., 2015). Além disso, a perda da homeostase em diferentes sistemas e órgãos está associada ao aumento da vulnerabilidade ao desenvolvimento de diversas patologias. Cabe destacar que o rápido crescimento demográfico no número de idosos tem como consequência um importante aumento no número de indivíduos com declínio cognitivo (Ballesteros et al., 2015; Hurd et al., 2013). É importante ressaltar então que a idade é o principal fator de risco para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas.

Diversas alterações podem ser observadas tanto no processo de envelhecimento quanto na fisiopatologia de doenças neurodegenerativas. Entre estas alterações destacam-se prejuízos na função mitocondrial, estresse oxidativo, acúmulo anormal de proteínas, alterações no metabolismo do ferro além de excitotoxicidade e inflamação (Benceet al., 2001; Halliwell 2001; Jenner 2003; Zeevalk et al. 2005).

Atualmente, os exossomos estão sendo vistos como uma importante ferramenta para diagnóstico e prognóstico de doenças neurodegenerativas, já que apresentam um importante papel na comunicação celular, sendo mediadores de processos indispensáveis para o funcionamento fisiológico cerebral (Brites & Fernandes, 2015; Gupta & Pulliam, 2014). Os exossomos são microvesículas esféricas geradas através da invaginação da membrana de corpos multivesiculares presentes na via endocítica e são liberadas para o meio extracelular quando se fundem à membrana citoplasmática, como ilustrado na Figura 1. (Kourembanas, 2015; Perez-Gonzalez et al., 2012; Simpson et al., 2008). Diversos tipos de células (neurônios, astrócitos, microglia e plaquetas) podem secretar exossomos para o espaço extracelular, além disso, essas vesículas podem ser isoladas de meios de cultura e de vários

fluidos corporais como soro, plasma, urina e líquido cefalorraquidiano (Bellingham et al., 2012; Gupta e Pulliam, 2014; Lee et al., 2010).

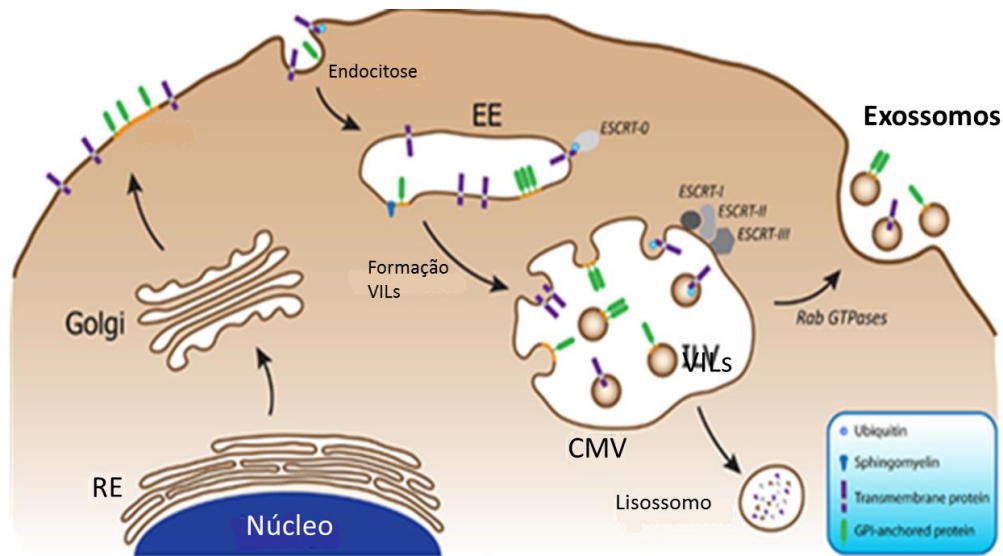


Figura 1. Biogênese dos exossomos a partir da membrana dos corpos multivesiculares e sua secreção para o espaço extracelular (Bellingham et al., 2012).

Os exossomos fazem parte de um grupo de vesículas chamado vesículas extracelulares (EV's) que englobam, além dos exossomos, as microvesículas e se diferenciam pelo tamanho, biogênese e por proteínas de superfície (Lee et al., 2012). Eles parecem estar relacionados ao desenvolvimento de diversas doenças neurodegenerativas, pois diversos estudos demonstram que eles podem ser os responsáveis por liberar proteínas como proteína príon, α -sinucleína, proteína tau e a superóxido dismutase (SOD), como mostra a figura 2 (Fevrier et al. 2004; Gomes et al. 2007; Rajendran et al. 2014). Recentemente, Fröhlich & colegas (2014) demonstraram um papel dos exossomos na transferência de moléculas com atividade antioxidante, especificamente a SOD e a catalase, entre oligodendrócitos e neurônios, demonstrando o papel na comunicação e transferência de moléculas entre estas células.

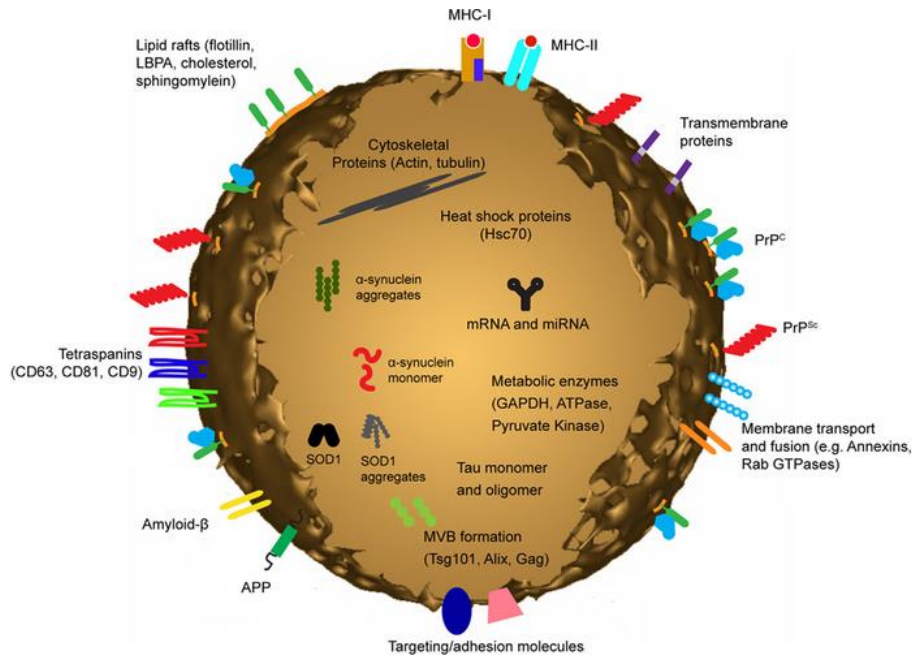


Figura 2. Composição dos exossomos: proteínas específicas de membrana e intracelulares (Lee et al., 2010).

Nosso grupo de pesquisa estuda os efeitos do envelhecimento fisiológico e do exercício físico sobre o perfil dos exossomos. Recentemente, demonstramos níveis aumentados de espécies reativas em exossomos circulantes de ratos de 21 e 26 meses. Adicionalmente, o marcador exossomal, CD63, e a enzima acetilcolinesterase, AChE, encontram-se alterados em exossomos circulantes destes animais envelhecidos.

Considerando que o envelhecimento é um dos principais fatores de risco para doenças degenerativas, é possível inferir que alterações no perfil exossomal no envelhecimento estejam ligadas à susceptibilidade a essas doenças.

A enzima SOD, que faz parte do conteúdo exossomal, apresenta um papel antioxidante bastante importante através da sua ação catalisadora da reação do radical ânion superóxido O_2^- em peróxido de hidrogênio e água. Já foram descritas na literatura três isoformas distintas da enzima, SOD-cobre e zinco (SOD1), SOD manganês (SOD2) e SOD extracelular (SOD3) (Dasuri et al., 2013). A SOD1 é ligada ao desenvolvimento de uma doença neurodegenerativa bastante estudada, a Esclerose Lateral Amiotrófica, ELA (Tsitkanou et al., 2016; Stoica et al., 2016; Roggenbuck 2016), caracterizada pela paralisia progressiva e irreversível do sistema nervoso motor, atrofia muscular e insuficiência respiratória (Geevasinga et al., 2016). Outros estudos demonstram que a enzima induz a

liberação de exossomos por astrócitos e que estes secretam substâncias tóxicas para neurônios motores (Basso et al., 2013; Nagai et al., 2007). Isto provavelmente ocorre porque a agregação de SOD1 causaria grande neurotoxicidade, levando à morte celular (Grad et al., 2014).

Vários estudos avaliaram o impacto do envelhecimento sobre a atividade de SOD em diferentes tecidos (Siqueira et al., 2005; Ciriolo et al., 1991; Semsei et al., 1991; Gupta et al., 1991). Considerando que os exossomos são capazes de transportar SOD, nosso grupo avaliou a atividade da enzima SOD em exossomos circulantes de ratos Wistar. Houve uma redução da atividade da SOD em exossomos de ratos de 26 meses, considerados animais envelhecidos. Assim, é de interesse determinar se ocorre redução do conteúdo de isoformas de SOD em exossomos de animais envelhecidos.

2. Justificativa

O envelhecimento populacional e o consequente aumento da incidência de doenças degenerativas justificam o esclarecimento dos mecanismos fisiológicos envolvidos com o envelhecimento normal.

O nosso grupo de pesquisa recentemente observou uma redução significativa na atividade da enzima SOD em exossomos circulantes de ratos Wistar machos envelhecidos. Considerando o importante papel da isoforma 1 da enzima (SOD1) em exossomos, já envolvida a doenças neurodegenerativas, como a Esclerose Lateral Amiotrófica, sugerimos que a redução da atividade da SOD esteja relacionada com a redução no conteúdo de SOD1.

3. Objetivo

O objetivo do trabalho foi avaliar os níveis da enzima SOD1 em exossomos circulantes de ratos Wistar no processo de envelhecimento.

4. Materiais e Métodos

Este estudo caracteriza-se como um estudo experimental que envolve uso de material biológico armazenado.

4.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos de 3 e 26 meses de idade (n=4) provenientes do Centro de Reprodução de Animais de Laboratório (CREAL- UFRGS). Os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia (UFRGS) durante o processo de envelhecimento em condições padrão de biotério com 12 horas de claro/escuro, temperatura controlada (22 ± 2 °C), comida e água *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Laboratório (CEUA) (número do projeto #23464).

4.2. Preparo das amostras

Os animais foram eutanasiados por decapitação em ambiente apropriado (baixa luminosidade, silencioso e longe de outros animais) por pesquisador com treinamento e experiência. O ambiente foi cuidadosamente higienizado antes do ingresso do animal na sala. A decapitação foi realizada em guilhotina adaptada para roedores (Insight®) sem anestesia prévia para não alterar bioquimicamente a amostra. Os métodos utilizados seguiram as conformidades propostas pelas “Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA”.

Após a decapitação, o sangue troncular foi coletado em tubos sem anticoagulante, centrifugado a 10.000 rpm em temperatura ambiente por 10 minutos e após, o soro resultante foi transferido para um tubo (1,5 mL) e armazenado a -80 °C para posterior isolamento dos exossomos.

4.3. Isolamento dos exossomos circulantes

O isolamento dos exossomos do soro foi realizado utilizando um kit específico miRCURY™ Exosome Isolation Kit (Exiqon, MA, USA). Um volume de 0,6 mL de soro foi centrifugado por 5 minutos a 10,000 x g para a remoção de detritos celulares. Após, 0,5 mL do sobrenadante foi transferido para um vial onde foi adicionado 200 µL de tampão de precipitação seguido de uma incubação de 60 minutos a 4°C. Após a incubação, uma nova centrifugação de 30 minutos a 1,500 x g foi realizada em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuscitado em 270 µL de tampão de ressuspensão usando um vórtex. Os exossomos isolados foram armazenados à -20 °C até o dia dos experimentos.

4.4. Western Blot

A técnica de Western blot foi realizada para avaliar os níveis de SOD1 nos exossomos circulantes. A concentração de proteínas foi quantificada através do método do azul de Coomassie (Bradford, 1976), e as amostras foram incubadas com solução Laemmli (5 min/95 °C).

Foi realizada uma padronização do método visando avaliar qual a concentração de proteínas seria mais adequada para quantificar o conteúdo de SOD1. As concentrações utilizadas foram de 10, 20, 30 e 40 µg de proteínas em 30 µL de amostra, volume ideal para ser pipetado no gel de poliacrilamida.

A concentração de proteínas pipetada no gel foi de 20 µg conforme determinado pela padronização. As proteínas foram separadas por eletroforese em um gel de poliacrilamida 14% (SDS-PAGE, 1.5 mm, 130 volts) e transferidas para uma membrana PVDF (Millipore). A membrana foi bloqueada com leite em pó desnatado a 5% em TTBS e incubada com o anticorpo primário anti-SOD1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) overnight a 4°C. Posteriormente, a membrana foi novamente incubada com o anticorpo secundário (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) durante 2 horas a temperatura ambiente. Um substrato preparado para Western Blot foi utilizado e as proteínas imunorreativas foram visualizadas através de uma exposição ao filme raio-X. As proteínas foram quantificadas pela mensuração da intensidade da banda (área X OD) usando um software Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). Um padrão molecular (RPN 800 rainbow full range Bio-Rad, CA, USA) foi utilizado como referência para determinar o peso molecular das bandas. O método de Ponceau foi utilizado para normalização.

4.5. Análise estatística

Os dados foram coletados e armazenados em uma planilha (Microsoft Excel). Os resultados foram analisados utilizando Teste T e o nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

4.6. Considerações Éticas

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA/UFRGS, número 23464). Todos os experimentos realizados estiveram de acordo com os critérios estabelecidos pela lei Arouca (11.794), pelas Diretrizes

da Prática de Eutanásia do CONCEA (2013) e pelo “*Guide for Care and Use of Laboratory Animals*” (NIH publication No. 8023, revised 2011).

5. Resultados

5.1 . Padronização

A padronização realizada, visando avaliar qual a concentração de proteínas seria mais adequada para quantificar o conteúdo de SOD1 em exossomos circulantes de ratos Wistar, foi realizada com as concentrações de 10, 20, 30 e 40 μg de proteínas em 30 μL de amostra, como mostra a figura 3.

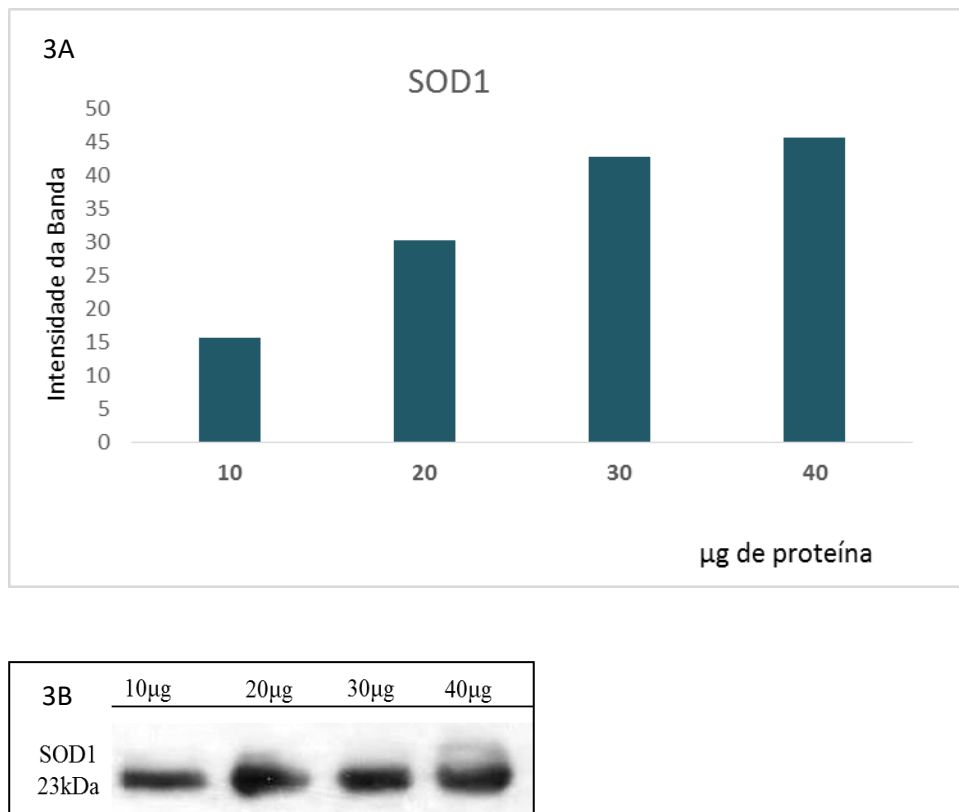


Fig.3 Padronização de concentrações de proteínas totais em fração exossomal para determinação do conteúdo de superóxido dismutase 1 (SOD1). (A) Intensidade da banda (área X OD). (B) Western blotting representativo.

A proteína de 23 kDa foi detectada. Houve uma curva dependente de concentração. A concentração escolhida para a realização dos ensaios foi de 20 μg .

5.2. Conteúdo de SOD1 em exossomos circulantes de ratos Wistar

O Teste T não indicou diferença significativa no conteúdo de SOD1 em exossomos circulantes de ratos Wistar entre os animais de 3 e 26 meses de idade, como ilustrado na Figura 4.

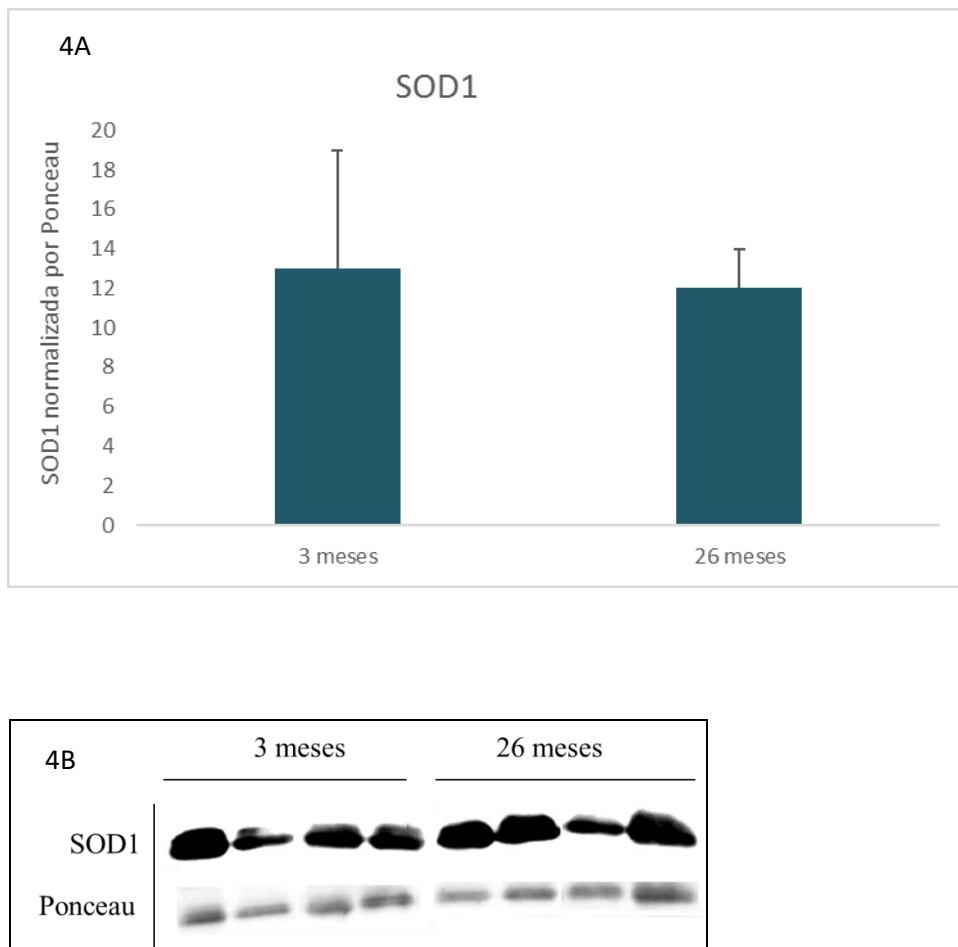


Fig.4 Conteúdo de SOD1 em exossomos circulantes de ratos de 3 e 26 meses de idade (n=4). (A) Intensidade da banda (área X OD) normalizada por Ponceau ($p>0,05$). (B) Western blotting.

6. Discussão

Neste trabalho, não foi observada diferença significativa no conteúdo de SOD1 em exossomos circulantes de ratos Wistar de 3 e 26 meses de idade.

Trabalhos prévios do nosso grupo de pesquisa demonstraram uma diminuição na atividade total da SOD em animais de 26 meses de idade, portanto podemos sugerir que o conteúdo de SOD1 não está envolvido com a redução na atividade previamente observada.

Um fator que pode alterar a atividade total da enzima, mas não necessariamente o seu conteúdo é a agregação. Diversos estudos sugerem que a agregação de uma forma mutante de SOD1 é característica de doenças neurodegenerativas como a ELA e podem resultar tanto na perda da atividade da enzima, como na morte celular por serem neurotóxicos (Brundin et al., 2010; Much et al., 2011; Grad et al., 2014). Sundaramoorthy e colaboradores (2013) demonstraram que moléculas mutantes ou o enovelamento de SOD1 em neurônios são capazes de inibir o transporte de proteínas entre o complexo de Golgi e o retículo endoplasmático, acarretando na fragmentação destas organelas e consequente apoptose. Fröhlich e colaboradores (2014) demonstraram que exossomos derivados de oligodendrócitos foram capazes de transferir enzimas antioxidantes, como a catalase e a própria SOD, para neurônios. Ainda alguns estudos sugerem que o transporte de agregados de SOD1 na Esclerose Amiotrófica Lateral seja realizado pelos exossomos, já que a enzima está presente nos exossomos de mamíferos e estes conseguem transferir a SOD1 de forma parácrina (Grad et al., 2014; Kim et al., 2013; Gomes et al., 2007).

A atuação de chaperonas relacionadas à agregação de SOD1 também tem sido alvo de muitos estudos, pois estas auxiliam na prevenção da formação de agregados e também na própria desagregação destes (Massignan et al., 2007; Basso et al., 2009; Bhattacharya et al., 2014; Ciechanover & Y T Kwon, 2015). A superexpressão da chaperona HSP1a é capaz de reduzir a agregação de SOD1 e auxiliar assim na sobrevivência de neurônios motores em um modelo animal de ELA (Novoselov et al., 2013). A redução na agregação da SOD1 está relacionada à melhora dos sintomas da doença mesmo em estágios tardios, aumentando a força muscular e o número de unidades motoras. Assim, podemos inferir que alterações estruturais e funcionais nas chaperonas podem contribuir para a agregação da SOD1 e consequente alteração da atividade enzimática. Assim, é possível sugerir que a redução da

atividade global observada em exossomos circulantes esteja relacionada com o conteúdo e atividade de chaperonas, como a HSP11a.

É possível inferir ainda que a atividade diminuída da SOD observada em exossomos de ratos envelhecidos esteja relacionada a outras isoformas da enzima. Uma importante fonte do radical superóxido são as mitocôndrias, onde a isoforma 2 da enzima (MgSOD/SOD2) é responsável por neutralizar aproximadamente metade da produção.

É importante destacar que componentes mitocondriais, como proteínas mitocondriais e mtDNA, foram detectados em vesículas extracelulares, que foram observados em células tronco mesenquimais e astrócitos, como ilustra a figura 5 (Phinney et al., 2015; Hayakawa et al., 2016). Assim, pode-se sugerir que a queda na atividade total da enzima observada em vesículas extracelulares circulantes de ratos de 26 meses de idade possa estar relacionada à SOD2.

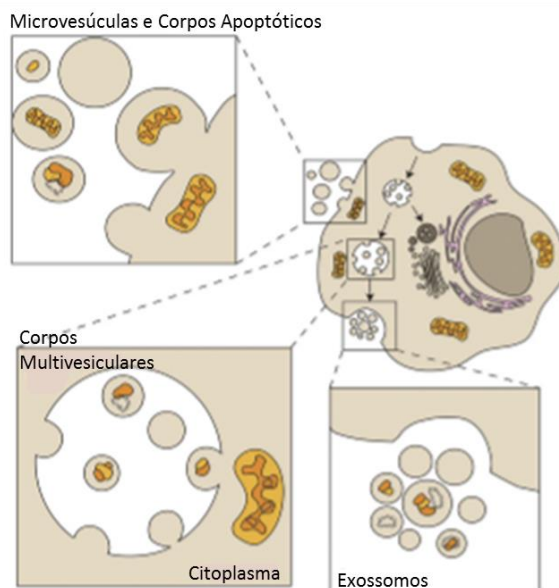


Figura 5. Ilustração de componentes mitocondriais em vesículas extracelulares (Torralba et al., 2016).

Outro elemento que desempenha um importante papel no desenvolvimento de diversas patologias e pode afetar a atividade exossomal da SOD são os microRNAs (miRNAs). Os miRNAs são um dos principais conteúdos encontrados dentro de exossomos (Baran et al., 2010; Lee et al., 2010). Diversos miRNAs estão sendo analisados e cada um apresenta um diferente efeito nos níveis e na atividade da SOD. O miRNA-23a-3p por exemplo, quando injetado através de cirurgia estereotáxica no encéfalo de ratos, foi capaz de aumentar a

atividade da enzima (Zhao et al., 2014). Já a expressão do miRNA-25 reduziu a atividade da SOD em pacientes sépticos (Yao et al., 2015). Yi e colaboradores (2016) investigaram o papel do microRNA-182 (miRNA-182) em ratos expostos à isquemia. Os autores puderam observar que a atividade da SOD nestes animais estava diminuída, porém quando a expressão do miRNA-182 estava inibida a atividade da enzima era restaurada. Assim, podemos inferir que alterações na expressão de miRNAs podem alterar consequentemente a atividade da superóxido dismutase.

Proteínas e peptídeos relacionados a outras doenças degenerativas, como o peptídeo beta-amiloide ($A\beta$) relacionado à Doença de Alzheimer, também podem ser carregados e transferidos por exossomos e podem influenciar a atividade da enzima SOD. Um estudo em ratos transgênicos que superexpressavam a SOD2 demonstrou que o aumento no nível de superóxido induzido pelo peptídeo $A\beta$ e também déficits induzidos pelo mesmo peptídeo no hipocampo destes animais foram reduzidos (Ma et al., 2011). Sharma e colegas (2016) investigaram a ação do peptídeo $A\beta_{1-42}$ sobre a atividade de enzimas antioxidantes em córtices e hipocampos de ratos submetidos a uma cirurgia estereotáxica para a administração do peptídeo. Os resultados demonstraram uma redução significativa na atividade da SOD e também da catalase.

7. Considerações Finais

Do nosso conhecimento, este foi o primeiro estudo que avaliou o efeito do envelhecimento sobre o conteúdo de SOD1 em exossomos circulantes. A diminuição na atividade total desta enzima em exossomos circulantes, observada previamente em outros trabalhos do nosso grupo de pesquisa, não está relacionada com o conteúdo de SOD1.

Podemos sugerir que a redução na atividade da SOD está relacionada com outros fatores, como a atividade de outras isoformas da enzima, como a SOD 2, ou pela agregação da enzima que possa alterar a sua atividade. Os mecanismos pelos quais a atividade da SOD encontra-se diminuída em exossomos circulantes de animais envelhecidos ainda necessitam ser elucidados, já que esta enzima desempenha um papel muito importante na manutenção celular.

8. Referências Bibliográficas

- Aaron Ciechanover & Yong Tae Kwon (2015). Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: therapeutic targets and strategies. *Experimental & Molecular Medicine* 47, e147.
- Ballesteros, S., Mayas, J., Prieto, A., Toril, P., Pita, C., de León Laura, P., Reales, J.M & Waterworth, J. A. (2015). A randomized controlled trial of brain training with non-action video games in older adults: results of the 3-month follow-up. *Frontiers in aging neuroscience*, 7.
- Basso M, Samengo G, Nardo G, Massignan T, D'Alessandro G, et al. (2009) Characterization of Detergent-Insoluble Proteins in ALS Indicates a Causal Link between Nitritative Stress and Aggregation in Pathogenesis. *PLoS ONE* 4(12): e8130.
- Basso M et al (2013) Mutant copper-zinc superoxide dismutase (SOD1) induces protein secretion pathway alterations and exosome release in astrocytes: implications for disease spreading and motor neuron pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem* 288:15699–15711.
- Bellingham, S. A., Guo, B., Coleman, B., & Hill, A. F. (2012). Exosomes: vehicles for the transfer of toxic proteins associated with neurodegenerative diseases? *Frontiers in physiology*, 3, 124.
- Bence, N. F.; Sampat, R. M.; Kopito, R. R. Impairment of the ubiquitin– proteasome system by protein aggregation. *Science* 292:1552–1555; 2001.
- Bhattacharya A, Wei R, Hamilton RT, Chaudhuri AR (2014). Neuronal cells but not muscle cells are resistant to oxidative stress mediated protein misfolding and cell death: role of molecular chaperones. *Biochem Biophys Res Commun.*;446(4):1250-4.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:218-254.
- Brites, D., & Fernandes, A. (2015). Neuro inflammation and depression: microglia activation, extracellular microvesicles and microRNA dysregulation. *Frontiers in cellular neuroscience*, 9.
- Brundin P, Melki R, Kopito R (2010) Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:301–307.
- Censo, 2010; Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.
- da Silva, M. D. G., & Boemer, M. R. (2009). Vivendo o envelhecer: uma perspectiva fenomenológica. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*, 17(3), 380-386.
- Ciriolo MR1, Fiskin K, De Martino A, Corasaniti MT, Nistico G, Rotilio G(1991) Age-related changes in Cu,Zn superoxide dismutase, Se-dependent and -independent glutathione peroxidase and catalase activities in specific areas of rat brain. *Mech Ageing Dev.*, 61(3), 287-97.
- Dasuri, K., Zhang, L., & Keller, J. N. (2013). Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 62, 170-185.
- Deleidi, M., Jäggle, M., & Rubino, G. (2015). Immune aging, dysmetabolism, and inflammation in neurological diseases. *Frontiers in neuroscience*, 9, 172.
- Ferreira, A.L.A.; Matsubara, L.S. (1997). Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, Sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Med Brasil*, 43(1): 61-68.
- Fevrier, B., & Raposo, G. (2004). Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Current opinion in cell biology*, 16(4), 415-421.

- Fröhlich, D., Kuo, W. P., Frühbeis, C., Sun, J. J., Zehendner, C. M., Luhmann, H. J., Pinto, S., Toedling, J., Trotter, J. & Krämer-Albers, E. M. Multifaceted effects of oligodendroglial exosomes on neurons: impact on neuronal firing rate, signal transduction and gene regulation. *Phil. Trans. R. Soc. B*, (2014), 369(1652), 1-13.
- Geevasinga, N.; Menon, P.; Özdinler, P. H.; Kiernan, M. C.; & Vucic, S.. Pathophysiological and diagnostic implications of cortical dysfunction in ALS. *Nature Reviews Neurology*, (2016), doi:10.1038/nrneurol.2016.140.
- Gomes, C., Keller, S., Altevogt, P., & Costa, J. (2007). Evidence for secretion of Cu, Zn superoxide dismutase via exosomes from a cell model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience letters*, 428(1), 43-46.
- Grad LI et al (2014) Intercellular propagated misfolding of wild-type Cu/Zn superoxide dismutase occurs via exosome-dependent and -independent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:3620–3625.
- Gupta, A., & Pulliam, L. (2014). Exosomes as mediators of neuroinflammation. *J Neuroinflammation*, 11(1), 68.
- Halliwell B. (2001) Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* 18, 685–716.
- Hayakawa, K., Esposito, E., Wang, X., Terasaki, Y., Liu, Y., Xing, C., et al. (2016). Transfer of mitochondria from astrocytes to neurons after stroke. *Nature* 535, 551–555.
- Ho, Y. S.; Gargano, M.; Cao, J.; Bronson, R. T.; Heimler, I.; Hutz, R. J. Reduced fertility in female mice lacking copper-zinc superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 273:7765–7769; 1998.
- Hurd, M. D., Martorell, P., Delavande, A., Mullen, K. J., & Langa, K. M. (2013). Monetary costs of dementia in the United States. *New England Journal of Medicine*, 368(14), 1326-1334.
- Jenner, P. (2003). Oxidative stress in Parkinson's disease. *Annals of neurology*, 53(S3), S26-S38.
- Kim DK et al (2013) EVpedia: an integrated database of high through put data for systemic analyses of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*.
- Kourembanas, S. (2015). Exosomes: vehicles of intercellular signaling, biomarkers, and vectors of cell therapy. *Annual review of physiology*, 77, 13-27.
- Lebovits, R. M.; Zhang, H.; Vogel, H.; Cartwright, J.; Dionne, L.; Lu, N.; Huang, S.; Matzuck, M. M. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 9782-9787; 1996.
- Lee, H. J., Suk, J. E., Patrick, C., Bae, E. J., Cho, J. H., Rho, S., ... & Lee, S. J. (2010). Direct transfer of α -synuclein from neuron to astroglia causes inflammatory responses in synucleinopathies. *Journal of Biological Chemistry*, 285(12), 9262-9272.
- Li, Y.; Huang, T. T.; Carlson, E. J.; Melov, S.; Ursell, P. C.; Olson, J. L.; Noble L. J. (...) & Chan, P. H. Deleted cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat. Genet.* 11: 376-381; 1995.
- Lima-Costa, M. F & Veras, R. (2003) Saúde pública e envelhecimento. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 19, n. 3, p. 700-701, ISSN 0102-311X.
- Ma, T., Hoeffler, C., Wong, H. A., Massaad, C., Zhou, P., Iadecola, C., Murphy, M.P., Pautler, R.G., Klann, E. Amyloid β -induced Impairments in Hippocampal Synaptic Plasticity are Rescued by Decreasing Mitochondrial Superoxide. *J Neurosci* . (2011) 31(15): 5589–5595.
- Massignan et al. (2007). Proteomic analysis of spinal cord of presymptomatic amyotrophic lateral sclerosis G93A SOD1 mouse. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 353:719–725.

- Matzuk, M. M.; Dionne, L.; Guo, Q.; Kumar, T. R.; Lebovitz, R. M. Ovarian function in superoxide dismutase 1 and 2 knockout mice. *Endocrinology* 139:4008–4011; 1998.
- McFadden, S. L.; Ding, D.; Burkard, R. F.; Jiang, H.; Reaume, A. G.; Flood, D. G.; Salvi, R. J. Cu/Zn SOD deficiency potentiates hearing loss and cochlear pathology in aged 129, CD-1 mice. *J. Comp. Neurol.* 413:101–112; 1999.
- Minciullo, P. L., Catalano, A., Mandraffino, G., Casciaro, M., Crucitti, A., Maltese, G., ...&Basile, G. (2015). Inflammaging and Anti-Inflammaging: The Role of Cytokines in Extreme Longevity. *Archivumimmunologiaeettherapiaeexperimentalis*, 1-16.
- Muller, FL., Song, W., Liu, Y., Chaudhuri, A., (...), Remmen, HV. (2006). Absence of CuZn superoxide dismutase leads to elevated oxidative stress and acceleration of age-dependent skeletal muscle atrophy.». *Free Radic. Biol. Med* [S.l.: s.n.] 40: 1993–2004.
- Munch C, O'Brien J, Bertolotti A (2011) Prion-like propagation of mutant superoxide dismutase-1 misfolding in neuronal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:3548–3553.
- Nagai M, Re DB, Nagata T, Chalazonitis A, Jessell TM, Wichterle H, Przedborski S (2007) Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nat Neurosci* 10:615–622.
- Nishida, T., Sugiyama, T., Kataoka, A., Tashiro, M., Yakushiji, M. & Ishikawa, M. (1993) Serum manganese superoxide dismutase (MnSOD) and histological virulence of ovarian cancer. *Asia Oceania J. Obstet. Gynaecol.* 19, 427-431.
- Novoselov SS1, Mustill WJ, Gray AL, Dick JR, Kanuga N, Kalmar B, Greensmith L, Cheetham ME (2013). Molecular chaperone mediated late-stage neuroprotection in the SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One.* 8(8):e73944
- Perez-Gonzalez, R., Gauthier, S. A., Kumar, A., & Levy, E. (2012). The exosome secretory pathway transports amyloid precursor protein carboxyl-terminal fragments from the cell into the brain extracellular space. *Journal of Biological Chemistry*, 287(51), 43108-43115.
- Phinney, D. G., Di Giuseppe, M., Njah, J., Sala, E., Shiva, S., St. Croix, C. M., et al. (2015). Mesenchymal stem cells use extracellular vesicles to outsource mitophagy and shuttle microRNAs. *Nat. Commun.* 6, 8472.
- Pociot, F., Lorenzen, T. & Nerup, J. (1993) A manganese superoxide dismutase (SOD2) gene polymorphism in insulin-dependent diabetes mellitus. *Dis. Markers* 11, 267-274.
- Rajendran L, Bali J, Barr MM, Krämer-Albers EM, Picou F, Raposo G, van der Vos KE, van Niel G, Wang J, Breakefield XO. Emerging roles of extracellular vesicles in the nervous system. *The Journal of Neuroscience.* 2014 Nov 12;34(46):15482-9.
- Roggenbuck, J; Quick, A & Kolb S.J. Genetic testing and genetic counseling for amyotrophic lateral sclerosis: an update for clinicians. *Genetics in Medicine* (2016) doi:10.1038/gim.2016.107.
- Sanchez, R. J.; Srinivasan, C.; Munroe, W. H.; Wallace, M. A.; Martins, J.; Kao, T. Y.; Le, K.; Gralla, E. B.; Valentine, J. S. Exogenous manganese ion at millimolar levels rescues all known dioxygen-sensitive phenotypes of yeast lacking CuZnSOD. *J. Biol. Inorg. Chem.* 10:913–923; 2005.
- Semsei, I., Rao, G. & Richardson, A. (1991). Expression of superoxide dismutase and catalase in rat brain as a function of age. *Mechanisms of Ageing and Development*, 58 (1), 13–19.
- Sharma, S., Verma, S., Kapoor, M., Saini, A., Nehru, B., (2016): Alzheimer's disease like pathology induced six weeks after aggregated amyloid-beta injection in rats: increased oxidative stress and impaired long-term memory with anxiety-like behavior, *Neurological Research*.
- Siqueira, IR., Fochesatto, C., Torres, ILS., Dalmaz, C., AB., Netto, CA., (2005). Aging affects oxidative state in hippocampus, hypothalamus and adrenal glands of Wistar rats. *Life Sciences*, 78 (3), 271-278.

- Simpson, R. J., Jensen, S. S., & Lim, J. W. (2008). Proteomic profiling of exosomes: current perspectives. *Proteomics*, 8(19), 4083-4099.
- Stoica L and Sena-Esteves M (2016) Adeno Associated Viral Vector Delivered RNAi for Gene Therapy of SOD1 Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front. Mol. Neurosci.* 9:56. doi: 10.3389/fnmol.2016.00056.
- Sundaramoorthy V et al (2013) Extracellular wildtype and mutant SOD1 induces ER-Golgi pathology characteristic of amyotrophic lateral sclerosis in neuronal cells. *Cell Mol Life Sci* 70:4181–4195.
- Torralba D, Baixauli F and Sánchez-Madrid F (2016) Mitochondria Know No Boundaries: Mechanisms and Functions of Intercellular Mitochondrial Transfer. *Front. Cell Dev. Biol.* 4:107.
- Tsitkanou S, Della Gatta PA and Russell AP (2016) Skeletal Muscle Satellite Cells, Mitochondria, and MicroRNAs: Their Involvement in the Pathogenesis of ALS. *Front. Physiol.* 7:403. doi: 10.3389/fphys.2016.00403.
- van Dis V, Kuijpers M, Haasdijk ED, Teuling E, Oakes SA, Hoogenraad CC, Jaarsma D (2014) Golgi fragmentation precedes neuromuscular denervation and is associated with endosome abnormalities in SOD1-ALS mouse motor neurons. *Acta Neuropathol Commun* 2:38.
- WHO. A guide for population-based approaches to increasing levels of physical activity: implementation of the WHO Global Strategy on Diet, Physical Activity and Health. Geneva, World Health Organization, 2007.
- Yao, L., Liu, Z., [...], Tian, Y., Clinical evaluation of circulating microRNA-25 level change in sepsis and its potential relationship with oxidative stress. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8(7):7675-7684.
- Yi, H., Huang, Y., Yang, Liu, F.W., He, S., Hu, X. (2016). MicroRNA-182 aggravates cerebral ischemia injury by targeting inhibitory member of the ASPP family (iASPP), *Archives of Biochemistry and Biophysics*
- Zeevalk, G. D., Bernard, L. P., Song, C., Gluck, M., & Ehrhart, J. (2005). Mitochondrial inhibition and oxidative stress: reciprocating players in neurodegeneration. *Antioxidants & redox signaling*, 7(9-10), 1117-1139.
- Zhao, H., Tao, Z, Wang, R., Liu, P., Yan, F., Li, J., Zhang, C., Ji, X., Lui, Y. (2014). MicroRNA-23a-3p attenuates oxidative stress injury in a mouse model of focal cerebral ischemia-reperfusion. *Brain Res.* 1592:65-72.