

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA - UFU
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Avaliação da influência da idade na organização telomérica em
neurônios corticais de camundongos

Ana Paula Caetano Procópio

Monografia apresentada à Coordenação
do Curso de Biotecnologia da
Universidade Federal de Uberlândia,
para obtenção do grau de Bacharel em
Biotecnologia.

Uberlândia – MG
Janeiro – 2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA - UFU
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Avaliação da influência da idade na organização telomérica em
neurônios corticais de camundongos

Ana Paula Caetano Procópio

Prof. Dr. Alberto da Silva Moraes

Monografia apresentada à Coordenação
do Curso de Biotecnologia da
Universidade Federal de Uberlândia,
para obtenção do grau de Bacharel em
Biotecnologia.

Uberlândia – MG
Janeiro – 2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA - UFU
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Avaliação da influência da idade na organização telomérica em
neurônios corticais de camundongos

Ana Paula Caetano Procópio

Prof. Dr. Alberto da Silva Moraes
Instituto de Ciências Biomédicas

Homologado pela coordenação do Curso
de Biotecnologia em fevereiro de 2022

Nilson Nicolau Junior

Uberlândia - MG
Janeiro - 2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA - UFU
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Avaliação da influência da idade na organização telomérica em
neurônios corticais de camundongos

Ana Paula Caetano Procópio

Aprovado pela Banca Examinadora em: 21/01/2022

Nota: 89 pontos

Alberto da Silva
Moraes:21476112800

Digitally signed by Alberto da Silva
Moraes:21476112800
DN: cn=Alberto da Silva Moraes:21476112800, ou=UFU
- Universidade Federal de Uberlandia, o=ICPEdu, c=BR
Date: 2022.02.21 15:33:13 -03'00'

Prof. Dr. Alberto da Silva Moraes

Uberlândia, 21 de Janeiro de 2022

AGRADECIMENTOS

O processo de escrita desta monografia foi marcado por diversas experiências e momentos partilhados com pessoas especiais que merecem o devido agradecimento:

A Deus, por me orientar e conduzir até aqui.

Aos meus pais, e minha família, que foram meu suporte e minha maior fonte de incentivo em continuar trilhando o caminho da ciência durante toda a graduação. Sirlene e Jaider, o apoio de vocês foi o início de tudo e certamente crucial para alcançarmos esta vitória.

Aos meus colegas de curso e a todos os amigos mais próximos, que desde 2017 me acompanham colaborando com meu desenvolvimento pessoal e profissional. Vocês foram extremamente importantes.

Ao Prof. Dr. Alberto da Silva Moraes pela paciência, dedicação e excelente orientação neste trabalho, contribuindo para o meu crescimento acadêmico.

Ao mestre Henrique Ferreira Rodrigues por compartilhar as imagens coletadas em seu trabalho, possibilitando a escrita deste.

A todos os professores do curso de Biotecnologia por todo aprendizado.

A todos aqueles que direta ou indiretamente auxiliaram na construção deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

O processo de envelhecimento causa diversas alterações celulares em todo o organismo, de forma que se tornou potencial causador de impacto negativo na capacidade funcional do sistema nervoso central. Uma das principais características associadas ao envelhecimento celular consiste na diminuição do comprimento de telômeros a cada ciclo de divisão celular, culminando em senescência replicativa. Entretanto, pouco se sabe acerca de tais alterações em células pós-mitóticas como neurônios. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi identificar e avaliar alterações teloméricas em núcleos de neurônios corticais de camundongos de duas idades por meio da análise de imagem dos núcleos previamente isolados e submetidos a hibridação *in situ* fluorescente. Os resultados demonstram que as diferenças teloméricas observadas entre as idades são sutis, pelo fato de acontecerem em populações nucleares específicas. Além disso, as alterações observadas parecem não envolver o comprimento telomérico, como esperado em células pós-mitóticas de forma a indicar uma possível descompactação e reorganização cromatínicas com o envelhecimento com impactos na organização telomérica. Portanto, concluímos que os núcleos de neurônios corticais de camundongos mais velhos não apresentam perda ou degradação telomérica com o envelhecimento, mas sim, um processo de descompactação e reorganização cromatínicas com reflexos na organização da cromatina telomérica.

Palavras-Chave: Envelhecimento, neurônio e hibridação *in situ*.

ABSTRACT

The aging process causes several cellular changes throughout the body so has become a potential cause of negative impact on the functional capacity of the central nervous system. One of the main characteristics associated with cellular aging is the decrease in telomere length at each cell division cycle, culminating in replicative senescence. However, little is known about such changes in post-mitotic cells as neurons. Thus, the objective of this study was to identify and evaluate telomeric alterations of the cortical neuron nuclei of two-age mice utilizing of image analysis of nuclei previously isolated and submitted to fluorescent in situ hybridization. The results demonstrate that the telomeric differences observed between ages are subtle because they occur in specific nuclear populations. In addition, the observed changes do not seem to involve the telomeric length, as expected in postmitotic cells to indicate a possible chromatin decompression and reorganization with aging with impacts on telomeric organization. Therefore, we conclude that the cortical neuron nuclei of older mice do not present loss or telomeric degradation with aging, but rather, a process of chromatin decompression and reorganization.

Key words: Aging, neuron and in situ hybridization.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Envelhecimento	1
1.2 Diferenças entre envelhecimento e senescência celular	3
1.3 Telômeros: estrutura e função.....	6
1.4 O envelhecimento no Sistema nervoso central	12
2. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo Geral.....	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3. METODOLOGIA.....	17
3.1 Manutenção dos Animais	17
3.2 Isolamento dos núcleos	17
3.3 Hibridação <i>in situ</i> fluorescente	18
3.4 Análise de Imagem.....	19
3.5 Análise estatística.....	21
4. RESULTADOS	21
5. DISCUSSÃO	31
6. CONCLUSÃO	34
7. REFERÊNCIAS.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Resultado descritivo dos testes estatísticos realizados a partir dos dados resultantes da análise de imagem.....	22
Tabela 2	Análise correlacional dos parâmetros morfométricos teloméricos.....	28
Tabela 3	Análise comparativa da mediana dos núcleos com valores de sinais teloméricos entre 18 e 27, com os demais núcleos da população analisada.	29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura dos telômeros humanos, complexo Shelterin e formação de T-loop....	8
Figura 2	Problema de replicação final do DNA, “DNA end-replication problem”.....	10
Figura 3	Protocolo para isolamento dos núcleos de neurônios.....	18
Figura 4	Exemplo núcleo analisado. A. Imagem de um núcleo analisado contendo dois sinais teloméricos circulos em branco. B. Dados coletados a partir do plugin Telometer.....	20
Figura 5	Gráficos comparativos das funções de distribuição cumulativa para os 10 parâmetros morfométricos teloméricos.....	24
Figura 6	A análise da diferença da quantidade de núcleos em cada idade, após categorização dos dados.....	25

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ROS	Espécies reativas de oxigênio
ACL	Alteração cognitiva leve
AKT	Proteína serina/treonina quinase
AMP	Adenosina monofosfato
AMPK	Proteína cinase ativada por AMP
ATM	Ataxia telangiectasia (<i>Cinase ataxia telangiectasia mutated</i>)
ATP	Adenosina trifosfato
Cdk-2	Cinase dependente de ciclina 2
DDR	Danos no DNA
E2F	<i>Promoter binding factor</i>
FISH	Hibridação <i>in situ</i> fluorescente
hTERC	Componente de RNA não codificante
hTERT	Domínio com atividade de transcriptase reversa
LLPMCs	Células pós-mitóticas de longa vida
mTORC1	<i>Mechanistic target of rapamycin complex 1</i>
NHEJ	Junção de extremidade não homóloga clássica
PGC-1b	Coativador de fator de transcrição
POT1	Proteína 1 de proteção dos telômeros
pRb	Proteína do retinoblastoma
RAP1	Proteína de interação de TRF2
SASPs	Fenótipos secretores associados à senescência
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
TIN2	Fator nuclear 2 de interação com TRF1
TPP1	Homólogo de proteína de displasia adrenocortical de interação com POT1 e TIN2
TRF1	Fator 1 de ligação de repetição telomérica de fita dupla
TRF2	Fator 2 de ligação de repetição telomérica

1. INTRODUÇÃO

1.1 Envelhecimento

O envelhecimento é frequentemente referido como um estado e tende a ser classificado como "terceira idade" ou "quarta idade". Contudo, não é um estado, mas sim um processo de degradação gradual e diferenciado, caracterizado pelo declínio funcional progressivo da integridade fisiológica do tecido e da capacidade regenerativa do organismo, associado ao aumento da suscetibilidade a muitas doenças. Além disso, o envelhecimento é influenciado por fatores genéticos, escolhas de estilo de vida e exposições ambientais que eventualmente resultam em mortalidade. O processo de envelhecimento é uma decorrência inevitável da vida, e culmina na morte de células, tecidos, órgãos e conseqüentemente do organismo (CANCELA, 2007; SANTOS; ANDRADE; BUENO, 2009).

Estabelecido pela Organização das Nações Unidas, por meio da Resolução 39/125, o conceito de idoso para países em desenvolvimento refere-se àqueles com 60 anos ou mais, enquanto para países desenvolvidos são consideradas idosas as pessoas com idade a partir de 65 anos (SANTOS, 2010). Entretanto, o envelhecimento manifesta-se por declínio das funções de diversos órgãos e sistemas, que tendem a ser lineares em função do tempo, não se conseguindo definir um ponto exato de transição (DIAS et al., 2009; TEIXEIRA; GUARIENTO, 2010)

Do ponto de vista de Passerino e Pasqualotti (2006), o envelhecimento humano compreende todos os processos de transformações do organismo, tanto físicos quanto psicológicos. Já Papaléo Neto (2002) defende o envelhecimento como um processo dinâmico e progressivo, no qual há alterações morfológicas, funcionais e bioquímicas, responsáveis por alterar progressivamente o organismo culminando no aumento da vulnerabilidade (DA

SILVEIRA et al., 2010; NETTO, 2002; PASSERINO; PASQUALOTTI, 2006).

Diversas teorias foram propostas a respeito do envelhecimento como teorias celulares, fisiológicas ou evolutivas, teorias baseadas em órgãos ou sistêmicas e teorias genéticas. Dentre estas, há uma contínua polarização entre as teorias programadas do envelhecimento (por exemplo, as genéticas que defendem a ideia de que o envelhecimento é um processo determinado geneticamente, através de alterações específicas no padrão de expressão gênica) e aquelas que são descritas como teorias do 'uso e desgaste', estocásticas ou do erro (caracterizadas por danos aleatórios a biomoléculas vitais, defendem que o envelhecimento seja o resultado do acúmulo de agressões ambientais diárias, ocasionando a diminuição da capacidade do organismo em recuperar-se), e embora todas possuam alguma evidência, a maioria também possui falhas igualmente fortes. De fato, essas teorias apresentam a ideia de que o processo de envelhecimento seja unitário, porém, essa ideia foi substituída pelo fato desse processo ser multifatorial e envolver uma interação de mecanismos moleculares, celulares e sistêmicos (BALCOMBE; SINCLAIR, 2001; CALCINOTTO et al., 2019; D'AVILA et al., 2020; UYAR et al., 2020).

Acredita-se que todos os processos de envelhecimento, em consequência a exposição a fatores intrínsecos e extrínsecos, são causados pela falha dos mecanismos de homeostase e ao acúmulo gradual de danos moleculares e celulares. Associado a isso, implica-se mudanças genéticas e epigenéticas que envolvem a interação de vários mecanismos como: instabilidade genética, deterioração dos telômeros, perda da proteostase, desregulação dos sensores de nutrientes, alterações mitocondriais, disfunção de enzimas que metabolizam espécies reativas de oxigênio (ROS), dentre outras. Desta forma, considera-se que não há um fator independente e preponderante que impulsiona o envelhecimento, mas uma rede de processos altamente interligados (D'AVILA et al., 2020; TEIXEIRA; GUARIENTO, 2010).

Embora cada órgão do corpo seja composto por um tipo celular específico, com características próprias como longevidade, estrutura e taxa de divisão celular, todos os tecidos estão submetidos ao envelhecimento. Esse processo causa alterações do tipo nucleares, citoplasmáticas, da membrana celular e de componentes celulares (seja acúmulo ou redução de determinada substância), sendo potencial causador de impacto na capacidade funcional além de propiciar um aumento a suscetibilidade às doenças crônicas (TEIXEIRA; GUARIENTO, 2010; TOSATO et al., 2007; WAGNER et al., 2016).

O aparecimento de rugas e cabelos grisalhos, por exemplo, caracteriza algumas das alterações morfológicas ou fenotípicas no indivíduo idoso; as funcionais estão relacionadas às alterações nas atividades orgânicas; enquanto as modificações bioquímicas se relacionam diretamente às transformações das reações químicas do organismo. Quando ocorre necessidade de adaptação a novas situações da vida diária diz-se que há mudanças psicológicas; quando ocorre mudança das relações sociais devido ao declínio da produtividade e do poder econômico, denominam-se modificações sociais adquiridas com o envelhecimento (LITTIG; ALMEIDA, 2020). O ritmo, a duração e o impacto desses processos incluem diferenças entre indivíduos e grupos etários, dependendo da natureza genética, história social e psicológica (NERI, 2001).

Indivíduos ditos idosos apresentam em geral ressecamento e perda da elasticidade da pele, alterações funcionais em todos os sentidos, redução da resposta cardiovascular, atividade torácica restrita e capacidade pulmonar reduzida. Também apresentam diminuição da força muscular, resultando em movimentos mais lentos e perda de coordenação, ossos osteoporóticos e dificuldade de equilíbrio (DA SILVEIRA et al., 2010).

1.2 Diferenças entre envelhecimento e senescência celular

Os termos 'envelhecimento' e 'senescência' são frequentemente usados de forma intercambiável, visto que ambos são caracterizados por mudanças progressivas nas células,

tecidos ou órgãos do corpo, levando a um declínio na função celular e morte. Entretanto tais termos não são sinônimos, pois o primeiro se refere a qualquer processo e/ou conjunto de danos e alterações celulares relacionados ao tempo, enquanto o segundo descreve o período e as características reconhecíveis associadas à parada da atividade reprodutiva da célula (BALCOMBE; SINCLAIR, 2001; CALCINOTTO et al., 2019).

No início da década de 1960, o trabalho conduzido por Hayflick e Moorhead demonstrou que fibroblastos diploides humanos têm um potencial replicativo finito em cultura, sendo este evento, posteriormente, denominado como "limite de Hayflick" o qual pode ser definido como o número de divisões celulares completas possíveis antes do final da vida replicativa celular. Desse modo, o "limite de Hayflick" descreve o processo de senescência replicativa, ou seja, processo em que as células entram em um estado de parada replicativa irreversível (HAYFLICK, 2003; LIBERTINI, 2009). As primeiras observações conectando os telômeros diretamente ao envelhecimento foram feitas em 1986, por Cooke e Smith, com a análise do comprimento médio das repetições dos telômeros que cobrem os cromossomos sexuais nos espermatozoides e nas células adultas (AUBERT; LANSDORP, 2008). Em consonância, estudos conduzidos posteriormente, relataram a presença de telomerase enzimaticamente ativa em células pré senescentes, acompanhada de manutenção do comprimento dos telômeros e retardo no início da senescência. Dessa forma, o limite de Hayflick foi relacionado à perda progressiva de DNA telomérico a cada divisão celular que, eventualmente desencadeia pontos de verificação do ciclo celular impedindo novas divisões. Esse fenômeno existe em muitas espécies e se correlaciona com a expectativa de vida máxima (AUBERT; LANSDORP, 2008; RUBIN, 1997; UYAR et al., 2020).

Apesar das demonstrações feitas por Hayflick, o papel da senescência replicativa no envelhecimento humano é questionável, dado que as células presumivelmente se dividem para

equilibrar a perda normal celular ou em resposta a lesões, podendo se dividir muito mais vezes do que o necessário durante uma vida normal. Além disso, o envelhecimento se refere à perda de funções fisiológicas, que é exacerbada quando as interações regulatórias coordenadas entre os sistemas orgânicos são necessárias para manter a função, podendo refletir assim perda de função no nível celular com a idade, o que difere da parada do ciclo celular dependente do encurtamento telomérico em cultura *in vitro* (RUBIN, 1997). Dessa forma, pode se dizer que o envelhecimento celular e a senescência celular, são fenômenos diferentes e não são resultantes dos mesmos mecanismos.

A senescência celular ou replicativa é um atributo das células com capacidade proliferativa e descreve um processo ativo, geneticamente programado e permanente de declínio e cessação da proliferação de células mitóticas. Este fenômeno pode ocorrer em muitos cenários diferentes, tanto em processos fisiológicos (embriogênese, reparo e remodelação de tecidos) como patológicos (câncer, distúrbios neurológicos e cardiometabólicos) (SIKORA; BIELAK-ZMIJEWSKA; MOSIENIAK, 2018; UYAR et al., 2020). Já o envelhecimento da célula afeta qualquer tipo celular, independentemente de sua capacidade proliferativa (GAVA; ZANONI, 2005).

Além da perda telomérica, as células senescentes são caracterizadas por apresentarem alterações na morfologia e no padrão de expressão gênica, bem como pela secreção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, fatores de crescimento e proteases induzidas por ação dos fenótipos secretores associados à senescência (SASPs), responsáveis pelos efeitos parácrinos e sistêmicos dessas células. O fenótipo da célula senescente, diferentemente dos eventos de quiescência, diferenciação, ou morte celular, é considerado dinâmico, pois se altera de acordo com a fase particular do processo, bem como o tipo de célula, estímulos e contexto celular sendo percebida como uma consequência das interações de vias de sinalização específicas, já

que, em contraste com a autofagia ou apoptose, não possui genes específicos (CALCINOTTO et al., 2019; PASSOS et al., 2009; SHIN; KUCIA; RATAJCZAK, 2011).

As células senescentes acumulam nos tecidos e órgãos durante o envelhecimento causando um impacto na fisiologia normal do organismo e uma deterioração funcional progressiva, de forma que participam de patologias relacionadas à idade, como na osteoartrite e osteoporose, aterosclerose, glaucoma, diabetes e doenças neurodegenerativas. A carga de células senescentes é baixa em indivíduos jovens, mas aumenta com o envelhecimento e seu acúmulo pode ocorrer por diversos fatores, como doenças e/ou infecções crônicas, estresse oxidativo, ambiente hormonal, uso de certos medicamentos e exposição à radiação, envolvendo mecanismos mediados pelas proteínas p53/p21 e as proteínas p16 Ink4a/retinoblastoma (pRb) (CALCINOTTO et al., 2019; PASSOS et al., 2009; SIKORA et al., 2011; SIKORA; BIELAK-ZMIJEWSKA; MOSIENIAK, 2018).

1.3 Telômeros: estrutura e função

Os telômeros foram identificados na década de 1930 por HJ Muller e Barbara McClintock, quando a composição do material genético ainda era desconhecida. Apenas em 1978, ao mapear a sequência de DNA de ciliados eucarióticos unicelulares (*Tetrahymena*), Elizabeth Blackburn descreveu uma sequência repetitiva específica de DNA não codificante, rica em guanina, no final do cromossomo. A partir de então, com a introdução das tecnologias de genética molecular, o entendimento dessas estruturas tornou-se mais aprofundado (HERNÁNDEZ FERNÁNDEZ, 1999; HIYAMA; HIYAMA, 2007; MASON; PERDIGONES, 2013; VENKATESAN; KHAW; HANDE, 2017).

Os telômeros são estruturas nucleoproteicas especializadas presentes nas extremidades dos cromossomos eucarióticos, de comprimentos variáveis (entre 9 e 15 Kb para espécie humana, de acordo com a idade, órgão e o histórico proliferativo de cada célula) geralmente

organizados na forma de heterocromatina, constituídos por repetições da sequência 5'-TTAGGG-3' (em humanos e outros mamíferos), e por um complexo proteico específico associado ao DNA telomérico designado “*Shelterin*” que consiste num conjunto de proteínas distintas funcionalmente (AUBERT; LANSDORP, 2008; CIFUENTES-ROJAS; SHIPPEN, 2012; O’SULLIVAN; KARLSEDER, 2010).

O complexo *Shelterin* é constituído por seis proteínas: Fator 1 de ligação de repetição telomérica (TRF1 ou TERF1), fator 2 de ligação de repetição telomérica (TRF2 ou TERF2), proteína de interação de TRF2 (RAP1, também conhecida como TERF2IP), fator nuclear 2 de interação com TRF1 (TIN2 ou TINF2), proteína 1 de proteção dos telômeros (POT1), e proteína 1 de interação com TIN2 (TPP1, também conhecida como ACD). TRF1 e TRF2 ligam-se a porções de sequências teloméricas de fita dupla, enquanto POT1 se liga à porção 3’ de fita simples denominada *G-strand overhang* (Figura 1). Estas têm por função regular a síntese de DNA telomérico bem com garantir a regulação e manutenção do comprimento e da estrutura do telômero, através da modulação do acesso da telomerase e de fatores associados com a maquinaria de reparo de DNA (KONG; LEE; WANG, 2013; VICTORELLI; PASSOS, 2017; ZHU et al., 2019).

Os componentes do complexo *Shelterin* interagem com outros fatores, proteínas e enzimas (como RAD52, RAD54, BLM, WRN, MRN, tankyrase 1 e APOLLO) que auxiliam na geração de uma estrutura protetora nas extremidades dos cromossomos formando uma alça telomérica denominada T-loop (alça em T). Esta estrutura tem por função a proteção dos telômeros permitindo que as extremidades naturais do cromossomo sejam distinguidas das quebras de fita dupla, e é gerada pela invasão da porção *G-strand overhang* nas repetições TTAGGG de fita dupla. A TRF2 reprime a via de sinalização de danos no DNA dependente da cinase ataxia telangiectasia (ATM) e a junção de extremidade não homóloga clássica (NHEJ)

proporcionando o T-loop (M.STANSEL, 2001; O’SULLIVAN; KARLSEDER, 2010; VENKATESAN; KHAW; HANDE, 2017).

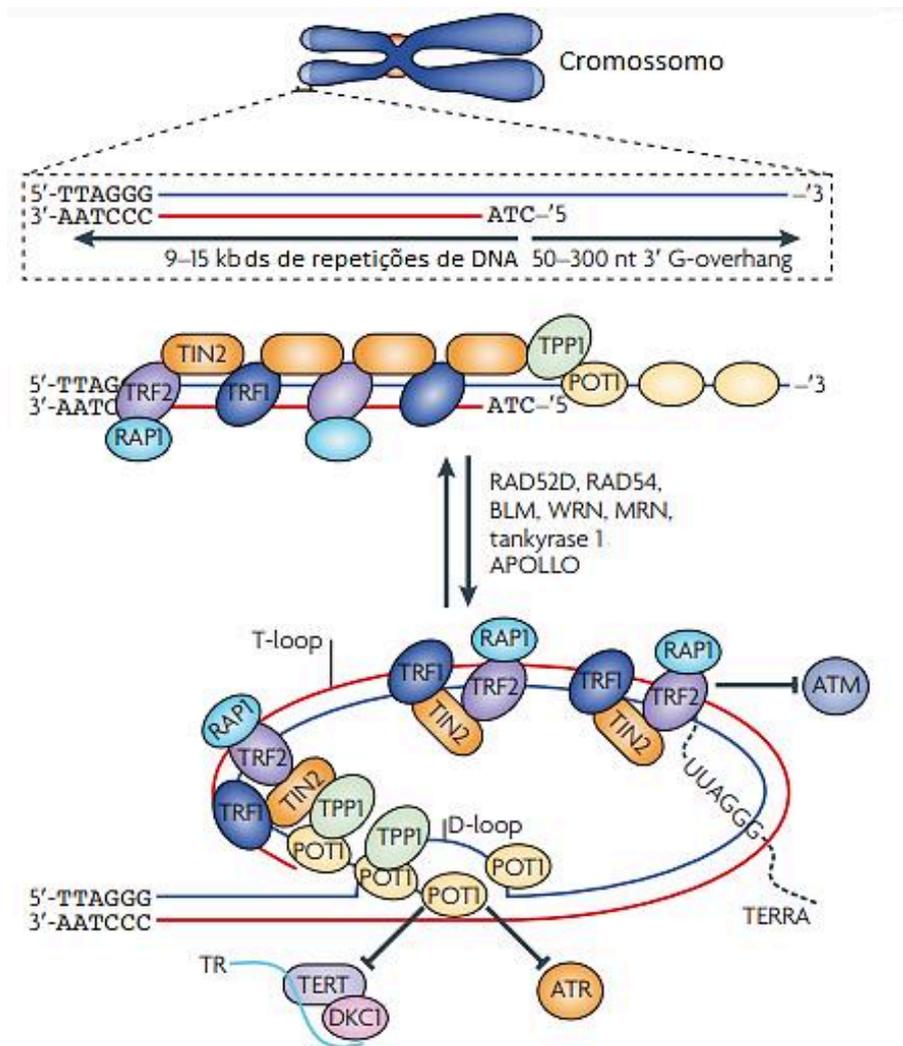


Figura1: Estrutura dos telômeros humanos, complexo *Shelterin* e formação de T-loop. Os telômeros humanos consistem em repetições TTAGGG, com uma fita principal rica em G e uma fita secundária rica em C. O complexo *Shelterin* consiste em seis proteínas TRF1; TRF2; RAP1; TIN2; TPP1; e POT1, as quais diretamente associadas aos telômeros facilita a formação do T-loop, estrutura protetora do telômero formada por um enrolamento do telômero causado pela *G-strand overhang*. Fonte: Adaptado de O’SULLIVAN; KARLSEDER, 2010.

A presença da sequência telomérica impede que os terminais cromossômicos sejam reconhecidos como danos ao DNA de fita dupla pela maquinaria de reparo, inviabilizando assim, a ocorrência de reações de fusão de extremidades além de eventos recombinatórios não esperados ou translocações, assegurando a manutenção da estabilidade cromossômica (CELLI; DE LANGE, 2005; VERDUN; KARLSEDER, 2007; ZHU et al., 2019). Os telômeros

participam de funções celulares importantes, como mitose e meiose, propiciam anelamento da telomerase assegurando a replicação completa do cromossomo e são responsáveis por ancorar os cromossomos ao envoltório nuclear, garantindo a estrutura tridimensional do genoma e a correta distribuição espacial dos cromossomos (LIBERTINI, 2019; PARSONS, 2003, 2003). Para manter a funcionalidade, um comprimento mínimo dos telômeros é necessário, e caso atinjam um tamanho crítico, os cromossomos sofrem problemas de separação durante a mitose, gerando associações teloméricas e instabilidade cromossômica (CHAN; BLACKBURN, 2004).

Em contraste com as sequências de codificação que têm replicação semiconservativa, os telômeros sofrem perdas de suas sequências repetitivas influenciadas por fatores epigenéticos, ambientais, e fatores de estresse inflamatório e oxidativo (BAYLIS et al., 2014; LINDQVIST et al., 2015; VON ZGLINICKI, 2002). Nas células somáticas, é natural que o DNA telomérico diminua de tamanho a cada divisão celular levando ao início da senescência replicativa e a perda de capacidade reprodutiva celular. Este é um processo progressivo, que resulta da incapacidade da DNA polimerase de replicar as extremidades lineares dos cromossomas, o chamado “end replication problem” ou, em alguns casos, de quebras de fita simples não reparadas causadas por danos oxidativos (PARSONS, 2003; SANDERS; NEWMAN, 2013; VICTORELLI; PASSOS, 2017).

O problema da replicação final (end replication problem) foi definido no início da década de 1970 por Watson e Olovnikov e é caracterizado pela perda de nucleotídeos terminais durante a replicação do DNA. Durante a fase S, o DNA cromossômico é copiado por uma forquilha de replicação que se move sempre no sentido 5'→3'. Neste processo, para a fita “líder” (*Leading strand*, ou fita principal), o DNA é copiado continuamente até seu último nucleotídeo, enquanto que para a fita descontínua (*Lagging-strand*, ou fita tardia) a síntese ocorre em pequenas partes chamadas de fragmentos de Okazaki, pela DNA polimerase com auxílio de

primers de RNA. Os fragmentos de Okazaki são subsequentemente conectados pela ligase e os primers de RNA são removidos e substituídos por DNA para formar uma fita contínua.

No entanto, na porção terminal da fita de DNA, a ausência do primer impossibilita que a DNA polimerase preencha a fita por completo, deixando uma lacuna, o que resulta na perda de cerca de cinco bases do material genético terminal (Figura 2). Aliado a isto, há a necessidade de gerar enzimaticamente nos telômeros a *G-strand overhang*, uma sequência 3' que compreende repetições de nucleotídeos de fita simples, responsável por facilitar a formação da estrutura do T-loop. Assim, pode-se dizer que a soma destes fatores acelera o encurtamento dos telômeros a cada ciclo celular (CHAN; BLACKBURN, 2004; O'SULLIVAN; KARLSEDER, 2010; VERDUN; KARLSEDER, 2007; VICTORELLI; PASSOS, 2017; ZHU et al., 2019).

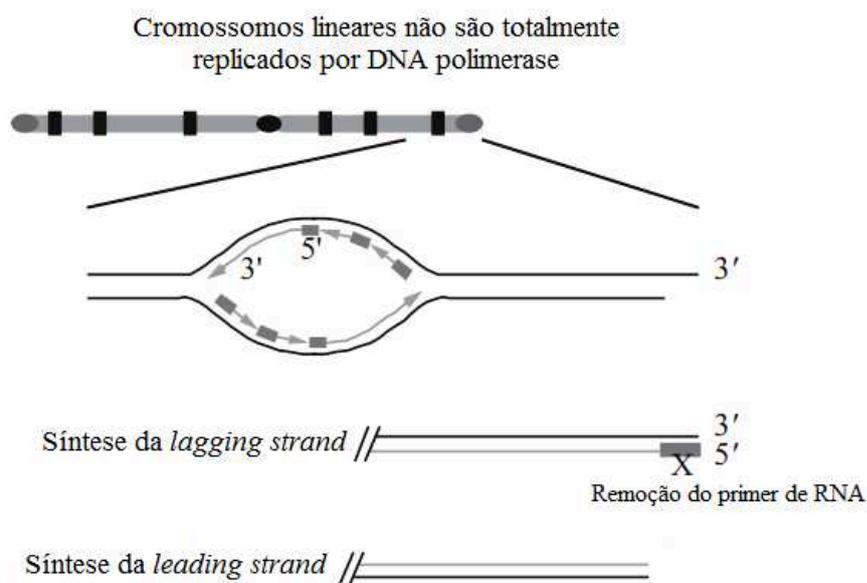


Figura 2: Problema de replicação final do DNA, “*DNA end-replication problem*”. Fonte: Adaptado de CHAN; BLACKBURN, 2004.

Esta limitação pode, em células com capacidade de proliferação, ser compensada por uma DNA polimerase RNA dependente específica, a telomerase. Esta enzima é um complexo ribonucleoproteico que compreende um domínio com atividade de transcriptase reversa (hTERT) e um componente de RNA não codificante (hTERC ou hTR). A telomerase pode adicionar repetições teloméricas às extremidades do cromossomo e evita a perda de telômero

dependente da replicação e, conseqüentemente, a senescência celular. No entanto, a telomerase não é expressa na maioria das células somáticas, ou ainda, em células maduras e em diferenciação, a atividade da telomerase geralmente apresenta-se baixa ou inexistente. Entretanto, as células germinativas expressam telomerase, mantendo assim o comprimento dos telômeros ao longo de inúmeras divisões celulares (DEY; CHAKRABARTI, 2018; HIYAMA; HIYAMA, 2007; JARDIM; ASHTON-PROLLA; MALUF, 2009; OZTURK; LI; TERGAONKAR, 2017).

Sendo assim, nas células que proliferam, o tamanho dos telômeros interfere diretamente no bom funcionamento dos cromossomos, visto que a perda da função telomérica resulta em fusões e quebras cromossômicas, translocações, perda de genes essenciais, silenciamento de genes próximos e aneuploidia. Há evidências crescentes que relacionam o comprimento telomérico com transtornos psiquiátricos, como a esquizofrenia (ARMANIOS, 2009; POLHO et al., 2015). O processo de encurtamento é visto então como um dos mecanismos moleculares subjacentes ao envelhecimento celular, o que corrobora com a hipótese de que o comprimento do telômero serviria como um relógio biológico regulando o tempo de vida das células normais (COTTLIAR; SLAVUTSKY, 2001, 2001; PARSONS, 2003; SOUSOUNIS; BADDOUR; TSONIS, 2014).

A nível molecular, quando o encurtamento crítico dos telômeros é alcançado, estes serão reconhecidos como quebras de DNA de fita dupla, as quais, por sua vez, induzem a resposta a danos no DNA (DDR), uma cascata de sinalização convergindo na cinase ATM, uma proteína associada ao mecanismo celular de resposta a lesões no DNA, que ativa a p53, uma proteína de supressão tumoral fortemente regulada por modificações pós-traducionais e regulada positivamente nas células senescentes, atuando como fator de transcrição ativando em primeira instância p21. A proteína p21, reguladora da transição da fase G1 para S, por sua vez, inibe a

Cdk-2 (Cinase dependente de ciclina 2) para bloquear a fosforilação de pRb (proteína do retinoblastoma). pRb hipofosforilada pode se ligar a fatores de transcrição E2F (promoter binding factor) impedindo-os de ativar genes de transcrição associados à proliferação celular levando à parada no ciclo celular na transição G1/S (SCHAAL; PILLAI; CHELLAPPAN, 2014; TASSO; LIMBERGER; MEZZARI, 2017; ZHU et al., 2019).

Estudos recentes relacionando o encurtamento dos telômeros e a disfunção mitocondrial, propuseram que a ativação de ATM induz a ativação de AKT (proteína serina/treonina quinase) e do complexo de rapamicina 1, mTORC1 (mechanistic target of rapamycin complex 1), resultando na biogênese mitocondrial dependente de PGC-1b (coativador de fator de transcrição) e na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) causando uma disfunção mitocondrial. A diminuição da produção de ATP em mitocôndrias disfuncionais aumenta a proporção de adenosina monofosfato (AMP) em relação a adenosina trifosfato (ATP), o que promove a senescência celular por meio da estimulação da proteína cinase ativada por AMP (AMPK), um mediador central do metabolismo celular. Assim, o encurtamento progressivo dos telômeros induz a senescência replicativa (SCHAAL; PILLAI; CHELLAPPAN, 2014; TASSO; LIMBERGER; MEZZARI, 2017; ZHU et al., 2019).

Um biomarcador sugerido de envelhecimento portanto, é o comprimento dos telômeros, pois, como visto, o encurtamento telomérico está relacionado a aceleração da senescência celular e apoptose em associação ao envelhecimento (CZEPIELEWSKI et al., 2018).

1.4 O envelhecimento no Sistema nervoso central

Anatomicamente, o sistema nervoso é dividido em sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico (SNP). O primeiro é constituído pelo encéfalo e pela medula espinhal, onde existe a substância cinzenta, caracterizada pela presença dos corpos celulares dos neurônios, mas não apenas destes, e a substância branca, composta, dentre outras

estruturas, pelos prolongamentos neuronais. O SNP compreende todo o sistema nervoso localizado fora do esqueleto axial, com suas vias aferentes (sensoriais) e eferentes (motoras), ambas com componentes somáticos e viscerais, gerais e especiais. O tecido nervoso é composto por dois grandes grupos celulares: neurônios, unidade básica primordial anatômica e fisiológica do sistema nervoso; e células da glia (neuroglia ou gliócitos). Estas últimas distinguem-se quanto à morfologia, a origem embrionária e às funções que exercem, porém, cumprem o mesmo propósito de sustentar, proteger, isolar e nutrir os neurônios (DÂNGELO; FATTINI, 1998; KAWAMOTO, 2009).

Os neurônios são as células responsáveis pela formação, recepção, integração e transmissão de impulsos nervosos, e anatomicamente compostos por: dendritos; corpo celular; axônio. Os dendritos são projeções finas do corpo neuronal geralmente muito ramificados e atuam como receptores do impulso que chega ao neurônio. O axônio é uma projeção maior envolvida por mielina em algumas seções, sendo que nas extremidades mais distantes do corpo celular, se ramifica em muitos terminais capaz de formar diversas sinapses com dendritos ou corpos celulares de outros neurônios. O corpo celular neuronal, também chamado de soma ou pericário, é a porção da célula que contém o núcleo e as demais organelas, sendo responsável por processar as informações trazidas por meio do potencial elétrico de campo local excitatório ou inibitório captado na maior parte das vezes pelos dendritos. Na extremidade da fibra nervosa está o terminal pré-sináptico, que é separado dos dendritos ou corpo do neurônio pós-sináptico por um espaço denominado fenda sináptica. As sinapses são, portanto, constituídas por terminal pré-sináptico, fenda, e porção pós-sináptica no próximo neurônio, sendo um dendrito, pericário ou um axônio (KAWAMOTO, 2009; MACHADO, 1979; TORTORA; DERRICKSON, 2016).

A partir do SNC partem os prolongamentos axonais dos neurônios, formando feixes que constituem o SNP, os nervos. Estes são encarregados de fazer as ligações entre o sistema

nervoso central e o corpo. Os nervos formados por prolongamentos de neurônios que trazem informações da periferia do corpo para o SNC constituem as vias sensoriais ou aferentes. Já os feixes de axônios de neurônios que transmitem impulsos do SNC para os músculos ou glândulas formam os nervos motores ou eferentes. Os nervos formados por axônios tanto de neurônios sensoriais quanto de motores são denominados nervos mistos (HALL; AC, 2011; MARIEB; HOEHN, 2009).

O sistema nervoso central (SNC) é responsável por receber e processar informações, garantindo a interpretação dos estímulos, além de regular a maioria das funções corporais e mentais desde as básicas às vitais. Neste trabalho, destacamos as funções cognitivas, compreendidas como uma série de funções mentais que envolvem aquisição, armazenamento, retenção e uso do conhecimento. As principais funções cognitivas cerebrais são denominadas e descritas como: i) Atenção, capacidade de selecionar os estímulos que chegam simultaneamente ao cérebro que são úteis para realizar uma atividade; ii) Memória, capacidade de codificar, armazenar e recuperar informações; iii) Linguagem, capacidade de compreender um sistema de comunicação simbólico; iv) Funções visuais-perceptivas, capacidade de reconhecer e diferenciar os estímulos; v) Funções executivas que incluem o controle da cognição, do pensamento e do comportamento (FREITAS; AGUIAR, 2012; PERETZ et al., 2011; PREISS et al., 2013; SHATIL, 2013).

Das diversas alterações observadas ao longo do envelhecimento, no que se referem às funções do sistema nervoso central, as cognitivas, como memória episódica e de trabalho e função executiva (melhor identificadas em resolução de problemas, raciocínio, processamento e aprendizagem de novas informações, atenção e manipulação do ambiente e habilidades de linguagem) são os domínios específicos mais afetados, e têm um declínio linear ou acelerado com o envelhecimento fisiológico (DRAGANSKI; LUTTI; KHERIF, 2013; REUTER-

LORENZ; SYLVESTER, 2005; TAM et al., 2015).

O déficit cognitivo leve ou alteração cognitiva leve (ACL) associada ao envelhecimento fisiológico pode-se apresentar das seguintes formas: alteração amnésica de domínio único ou múltiplo (quando afeta memória e outros domínios da cognição), não amnésico de domínio único ou múltiplo (outros domínios que não memória), além de sintomas neuropsiquiátricos como disforia, depressão, ansiedade e agitação psicomotora em casos mais raros (NORDON et al., 2009). O recrutamento neural no cérebro envelhecido, conhecido como "andaime compensatório", é usado para realizar tarefas menos novas, e pode ser uma estratégia que o cérebro usa para manter a função e a cognição (REUTER-LORENZ; PARK, 2014). Tal déficit cognitivo, além de bases vasculares (GORELICK et al., 2011), é resultante também de alterações celulares importantes. As células do sistema nervoso são afetadas e respondem ao envelhecimento da mesma forma que as células de outros sistemas orgânicos. As células do cérebro, por exemplo, experimentam quantidades aumentadas de estresse oxidativo, homeostase energética perturbada, e acúmulo de proteínas danificadas (MATTSON; MAGNUS, 2006; SERRANO; KLANN, 2004; TEIXEIRA; GUARIENTO, 2010).

É reconhecido que os neurônios sofrem alterações morfológicas, estruturais e funcionais com o envelhecimento, como declínio no transporte axonal, acúmulos de proteínas citoplasmáticas e de membrana, alteração da transmissão sináptica, plasticidade sináptica prejudicada e homeostase de cálcio alterada, além da diminuição na arborização e tamanho dos dendritos, e a redução nas espinhas ou espículas dendríticas, levando ao comprometimento da cognição e do movimento (BARRETO, 2020; PEREIRA JUNIOR, 2008; PEREIRA, 2019).

As informações disponíveis na literatura até o presente momento suportam a noção de que a perda de repetições dos telômeros contribui para o envelhecimento humano (BODNAR, 1998; COTTLIAR; SLAVUTSKY, 2001; UYAR et al., 2020). Entretanto, há dúvidas a respeito

da ocorrência de alterações a nível telomérico em células pós-mitóticas de longa vida (“LLPMCs”), como os neurônios, que podem exibir um tipo distinto de envelhecimento celular caracterizado por um declínio funcional progressivo não associado a um fenótipo de senescência evidente, já que, por ser uma célula pós-mitótica, pressupõe-se ausência de encurtamento telomérico significativo associado à senescência replicativa ao se comparar células “jovens” e “envelhecidas” (JACOME BURBANO; GILSON, 2020). Desse modo, é de extrema relevância estudos que investigam fatores relacionados à senescência e o envelhecimento em neurônios corticais, visto que nestes tipos celulares esses processos permanecem amplamente desconhecidos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar se o processo de envelhecimento em neurônios corticais de camundongos está associado com alterações teloméricas.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar parâmetros morfométricos de sinais teloméricos, visualizados por fluorescência com a técnica FISH, em núcleos de neurônios de camundongos jovens e adultos.
- Avaliar se há alterações morfológicas e numéricas nos sinais teloméricos em núcleos neuroniais de camundongos com o envelhecimento e comparar os dados entre os grupos de animais envolvidos.
- Verificar se as possíveis alterações morfológicas se correlacionam com alterações de comprimento telomérico em neurônios corticais de camundongos.

3. METODOLOGIA

As imagens de núcleos utilizadas neste trabalho derivam de experimentos realizados na dissertação de mestrado do discente Henrique Ferreira Rodrigues, mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas durante o período de março de 2011 a fevereiro de 2013 intitulada “O avanço da idade induz alterações na organização da cromatina e na ploidia de neurônios corticais de camundongos” (RODRIGUES, 2013). Portanto, boa parte da metodologia descrita abaixo corresponde a etapas realizadas antes do início do presente estudo, sendo a atividade deste especificamente a análise das imagens previamente obtidas.

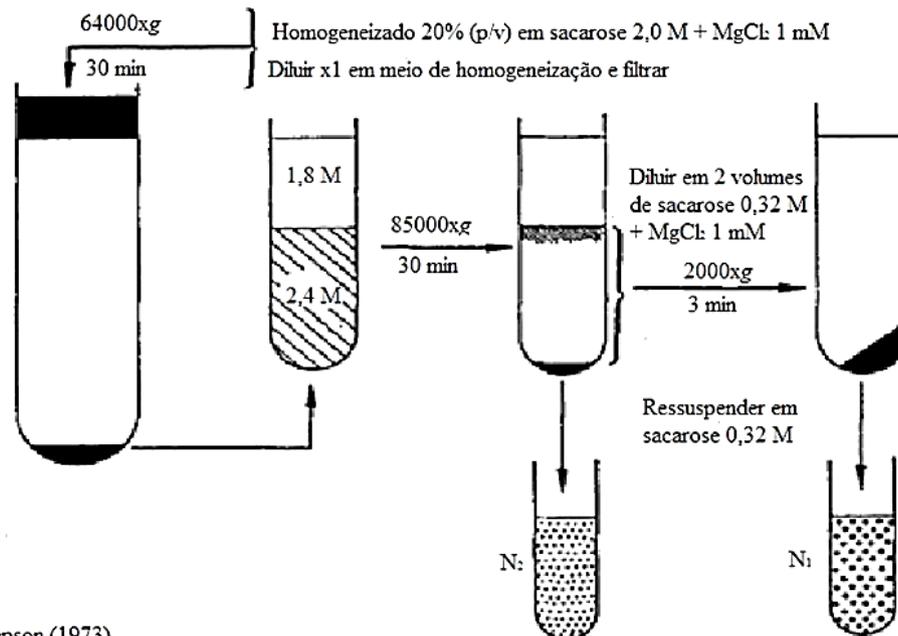
3.1 Manutenção dos Animais

Foram utilizadas fêmeas de camundongos Balb/c obtidas no Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade de Campinas, as quais foram divididas em dois grupos, jovens (4-8 semanas de idade) e adultas de meia-idade (55-65 semanas). Camundongos jovens são equivalentes a seres humanos com idade entre 10 e 16 anos, sendo esta faixa etária considerada fase da puberdade. Os camundongos de meia-idade são equivalentes aos seres humanos na faixa etária de 46 a 52 anos, sendo considerados pré-idosos (Flurkey et al., 2007). Os animais foram criados em condições controladas padrão e alimentados com ração extrusada (Nuvital1, Colombo, Brasil) e água ad libitum. Aproximadamente 20 animais em cada grupo foram utilizados para garantir que haveria tecido cerebral suficiente para o protocolo de extração nuclear, sendo o sacrifício por decapitação. Os procedimentos de cuidado e uso de animais no estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Universidade de Campinas (registro número 1608-1) e estão de acordo com as diretrizes do *Canadian Council on Animal Care*.

3.2 Isolamento dos núcleos

Os núcleos de neurônios utilizados neste trabalho foram extraídos utilizando os

protocolos descritos em Thompson (1973) e Pearson e col. (1983). Essencialmente, os córtices foram isolados dos cérebros dissecados, sendo esses homogeneizados e os núcleos isolados por ultracentrifugação em gradiente de sacarose, sendo então armazenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento de uso (Figura 3). Posteriormente foi feita a ressuspensão dos núcleos isolados, os quais foram aplicados em lâminas histológicas na forma de esfregaços.



Adaptado de Thompson (1973).

Figura 3: Protocolo para isolamento dos núcleos de neurônios. N1, população neuronal; N2, população glial. Fonte: RODRIGUES, 2013

3.3 Hibridação *in situ* fluorescente

Os núcleos isolados foram submetidos, à hibridação *in situ* fluorescente (FISH), utilizando a sequência de DNA do oligonucleotídeo semelhante a telômero sintetizada pela Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA). A marcação das sondas se deu por *nick-translation* com biotina-16dUTP (Bionick Labeling Kit, Life Technologies, Inc., França). A contra coloração foi realizada com DAPI no meio de montagem Vecta Shield®.

As preparações microscópicas de DNA FISH foram capturadas sob um microscópio de epifluorescência Zeiss Axiophot 2 equipado com uma lâmpada estabilizada de mercúrio HBO-

100W, como fonte de luz e filtros apropriados. Objetivas de imersão em óleo Zeiss Plan 25X/0,50, 40X/0,75 e 100X /1.4 foram usadas. As imagens digitais foram obtidas usando uma câmera de vídeo colorida Sony CCD-IRIS / RGB Hyper HAD e o software ISIS (MetaSystems, Altlussheim). Todos os experimentos com hibridação foram realizados no Laboratório de Citogenética e Epigenômica da Esalq/USP, chefiado pelo Prof. Dr. Mateus Mondin.

3.4 Análise de Imagem

Para o presente trabalho, nas análises das marcações teloméricas após FISH foi utilizado o plugin Telometer desenvolvido para rodar no software “open source” ImageJ (NIH) (plugin disponível em <https://demarzolab.pathology.jhmi.edu/telometer/index.html>) e descrito por Meeker e col. (MEEKER et al., 2002). A subtração de fundo das imagens foi feita utilizando um *Rolling Ball Radius* de valor 1, e o *threshold* aplicado para seleção dos spots teloméricos por intensidade de brilho (luminância) foi de 5 a 255.

Foram avaliados 474 e 348 núcleos provenientes de neurônios de animais jovens adultos e adultos de meia idade, respectivamente. Os sinais com tamanhos maiores do que o limite para ruído de fundo, e contidos dentro da área inscrita pela contracoloração com DAPI foram considerados sinais teloméricos. Além da contagem do número de sinais por núcleo, para cada sinal, ou spot intranuclear, o software forneceu informações acerca da luminância ou brilho total (Sum), médio (Mean), mínimo (Min) e máximo (Max), sendo determinada também a área ocupada pelo spot (Area) e a área total do núcleo (Area DAPI). Os resultados obtidos foram exportados para planilhas do Microsoft Excel (Microsoft Corp.) nas quais foram calculadas as médias aritméticas de cada parâmetro para cada núcleo, considerando como “n” o total de sinais teloméricos identificados em cada núcleo, e também alguns parâmetros adicionais, como explicado a seguir.

Um dos parâmetros analisados correspondeu ao número de sinais teloméricos

(parâmetro 1) por núcleo. Os valores de intensidade total de brilho de cada sinal foram somados, resultando na intensidade total de brilho telomérico por núcleo (parâmetro 2). Este valor foi dividido pelo número de sinais teloméricos encontrados, resultando no valor médio de intensidade total de brilho por sinal (parâmetro 3). Cada sinal possui valores mínimo, médio e máximo de brilho, considerando que a distribuição de luminância dos pixels dentro de cada sinal não é homogênea. Não obstante, o valor de intensidade total de brilho para um sinal telomérico específico é obtido por meio da multiplicação do brilho médio desse sinal pelo número de pixels que existem dentro do mesmo sinal (valor não fornecido pelo software, mas calculável), ou pela somatória das intensidades de brilho de cada um dos pixels.

Objetivando obter um valor único por núcleo, realizando a comparação entre os grupos, e considerando os núcleos como unidades de comparação, e não cada sinal telomérico medido, foi calculada a média aritmética por núcleo do brilho médio dos sinais ($(S(\text{Mean1}+\text{Mean2}+\dots+\text{Meann})/n \text{ sinais})$) (parâmetro 4). Os valores mínimo (parâmetro 5) e máximo (parâmetro 6) por núcleo foram escolhidos dentre os valores obtidos para todos os sinais. Adicionalmente, foram calculadas a somatória (parâmetro 7) e a média (parâmetro 8) das áreas ocupadas pelos sinais para o núcleo em questão. Por fim, foi determinado o percentual de área nuclear ocupado pela somatória das áreas teloméricas (parâmetro 9), sendo a área de referência a área total do núcleo (parâmetro 10), representada pela área da coloração DAPI, a qual também foi avaliada. Foram analisados, portanto, 10 parâmetros considerados representativos de cada núcleo, como exemplificado na Figura 4.

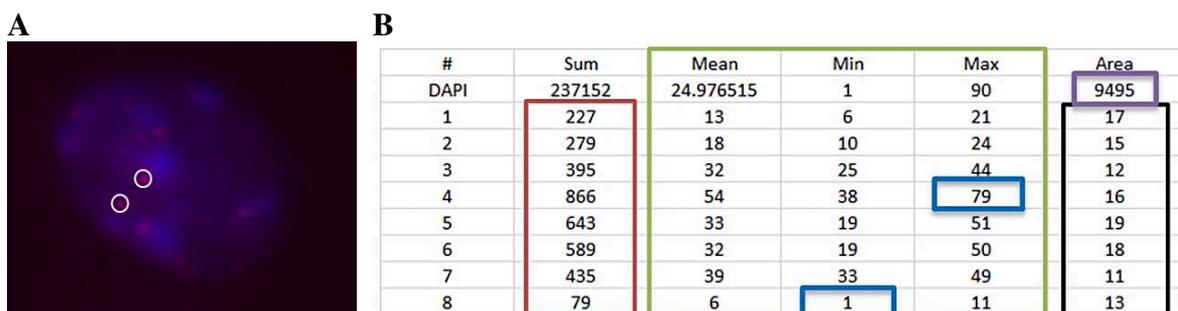


Figura 4: Exemplo núcleo analisado. **A.** Imagem de um núcleo analisado contendo dois sinais teloméricos circulos em branco. **B** Dados coletados a partir do plugin Telometer. Neste núcleo foram analisados 8 sinais identificados como sinais teloméricos (**parâmetro 1**); os dados demarcados em vermelho indicam a intensidade total de brilho de cada sinal cuja soma resulta em 3.513 unidades de luminância (**parâmetro 2**), com média aproximada de 439 (3.513/8) (**parâmetro 3**); a área demarcada em verde indica valores médio, mínimo, e máximo de brilho de cada sinal. Os valores da coluna *Mean* tiveram sua média calculada como descrito no texto (**parâmetro 4**). Os dados demarcados em azul indicam os valores mínimo e máximo de unidades de luminância (brilho), 1 (**parâmetro 5**) e 79 (**parâmetro 6**) respectivamente, encontrados na população total de sinais teloméricos avaliados nesse núcleo; a demarcação em preto indica os dados de área de sinais teloméricos cuja soma (**parâmetro 7**) e a média (**parâmetro 8**) são 121 e 15 pixels nesse núcleo, respectivamente; nesse núcleo especificamente, a área total ocupada pelos sinais teloméricos corresponde a cerca de 1,3% (**parâmetro 9**) da área nuclear total (**parâmetro 10**), demarcada em lilás, e equivalente a 9495 pixels.

3.5 Análise estatística

Os parâmetros descritos acima foram analisados com relação à normalidade de sua distribuição, por meio do teste de normalidade de *Chen-Shapiro*, implementado no Google Sheets, sendo esse o mais adequado, considerando dois grupos experimentais e $n > 50$ núcleos por grupo. Após confirmação de distribuição não normal, procedeu-se à estatística não paramétrica. O teste de hipóteses escolhido foi o *Mann-Whitney*, e a amplitude do efeito (*effect size*) foi determinada utilizando o coeficiente Δ de *Cliff*, sendo ambos os testes realizados utilizando as ferramentas disponíveis no software R-studio, um ambiente de desenvolvimento integrado gratuito para R (disponível em www.rstudio.com/products/rstudio/download/). Utilizando pacotes disponíveis para o software, foram calculados os coeficientes de correlação de Spearman para todos os parâmetros, totalizando 45 correlações por idade. As funções de distribuição cumulativa e os gráficos de diferenças foram plotados no Microsoft Excel.

4. RESULTADOS

A A análise estatística inicial mostrou pouca evidência de que o envelhecimento esteja associado com alterações teloméricas substanciais em neurônios corticais de camundongos. De acordo com a Tabela 1, é perceptível que, apesar de serem observadas diferenças estatísticas entre os grupos para alguns dos parâmetros avaliados, como em número de sinais (spots) teloméricos presentes por núcleo, por exemplo, essa diferença é negligenciável do ponto de

vista de tamanho do efeito (*effect size* 0,096). Não obstante a diferença estatisticamente significativa apresentada pelo teste de hipótese é contestável, ao considerar que núcleos com valores 11 e 12 como medianas para número de sinais teloméricos por núcleo, de fato, representem alguma alteração biológica real ou relevante, ou que o valor máximo de brilho observado nos spots, variando de 102 para 106 ($p = 0,0134$, com *effect size* negligenciável) seja uma variação importante, em uma escala de luminância de 0 a 255 unidades.

Tabela 1. Resultado descritivo dos testes estatísticos realizados a partir dos dados resultantes da análise de imagem.

Parâmetros	Mediana		Mann-Whitney	Cliff (δ)	Intervalo de confiança	
	Adultos jovens	Adultos de meia idade	p-value	Valor D e interpretação	IC inferior	IC superior
(1) Número de sinais (spots) teloméricos	11	12	0,0183	0,096 (negligenciável)	0,016	0,175
(2) Integração do brilho dos sinais teloméricos por núcleo	7878	8527	0,0190	0,096 (negligenciável)	0,016	0,174
(3) Média do brilho total por sinal	688	711	0,1162	0,0721 (negligenciável)	-0,007	0,151
(4) Intensidade do brilho médio por sinal	45	46,3	0,1183	0,048 (negligenciável)	-0,032	0,126
(5) Valor mínimo de brilho observado nos sinais teloméricos	7	8	0,3712	-0,0364 (negligenciável)	-0,116	0,044
(6) Valor máximo de brilho observado nos sinais teloméricos	102	106	0,0134	0,101 (negligenciável)	0,022	0,178
(7) Área nuclear total ocupada pelos sinais teloméricos	164	176	0,0401	0,084 (negligenciável)	0,004	0,163
(8) Área média ocupada por um sinal telomérico	14,5	14,4	0,6568	-0,091 (negligenciável)	-0,169	-0,012
(9) Área nuclear ocupada pelo total de sinais teloméricos (%)	3,96	3,11	< 0,0001	-0,204 (pequeno)	-0,281	-0,124
(10) Área nuclear total	4292	6100	< 0,0001	0,421 (médio)	0,348	0,489

Ainda de acordo com a Tabela 1, a princípio, as únicas diferenças relevantes, encontram-se no tamanho dos núcleos (área nuclear total, parâmetro 10), e no percentual de

área nuclear ocupada pelos sinais teloméricos (%), parâmetro 9), de forma que os adultos de meia idade apresentaram núcleos maiores, e menor percentual de área nuclear ocupada pelos sinais teloméricos. É importante notar que uma área nuclear maior afeta naturalmente a porcentagem de área ocupada por sinais teloméricos, especialmente considerando que a área absoluta ocupada por esses sinais variou muito pouco entre as idades (parâmetro 7), assim como a área de cada sinal telomérico (parâmetro 8), na qual não foi observada nenhuma alteração. Sendo assim, a diminuição do percentual de ocupação nuclear por sinais teloméricos nos animais mais velhos, não pode ser associada com alterações intrínsecas substanciais na organização dos telômeros, sendo uma consequência do aumento das áreas nucleares, não acompanhado por um aumento proporcional na área ocupada pelos sinais teloméricos. Tal consideração é justificada pela ausência de diferenças significativas nos demais parâmetros avaliados nesta análise inicial, visto que tais alterações intrínsecas se refletiriam na quantidade de sinais teloméricos, no tamanho destes, e na intensidade de seu brilho, conclusão esta que corrobora, a princípio, com a manutenção da estrutura telomérica em neurônios de camundongos ao longo do envelhecimento.

Entretanto ao analisar mais detalhadamente a distribuição dos dados através de gráficos de funções de distribuição cumulativa (Figura 5), nota-se algumas diferenças, na maioria das vezes sutis, para diversos parâmetros avaliados, indicando que as diferenças pouco ou não perceptíveis do ponto de vista de medidas de tendência central, podem ser mais facilmente identificadas em populações nucleares específicas quando se observa a distribuição dos dados utilizando esta abordagem.

É notável que para a maioria dos parâmetros avaliados, há predominância, mesmo que sutil, de núcleos de jovens adultos nas regiões de valores menores (Figura 5, parâmetros 1-10), o que não foi observado para núcleos de adultos de meia idade, exceto para os parâmetros de

brilho mínimo (Figura 5, parâmetro 5), área média por sinal telomérico (Figura 5, parâmetro 8) e área nuclear ocupada por sinais teloméricos (Figura 5, parâmetro 9), para os quais os núcleos de adultos de meia idade prevaleceram nas regiões de menor valor.

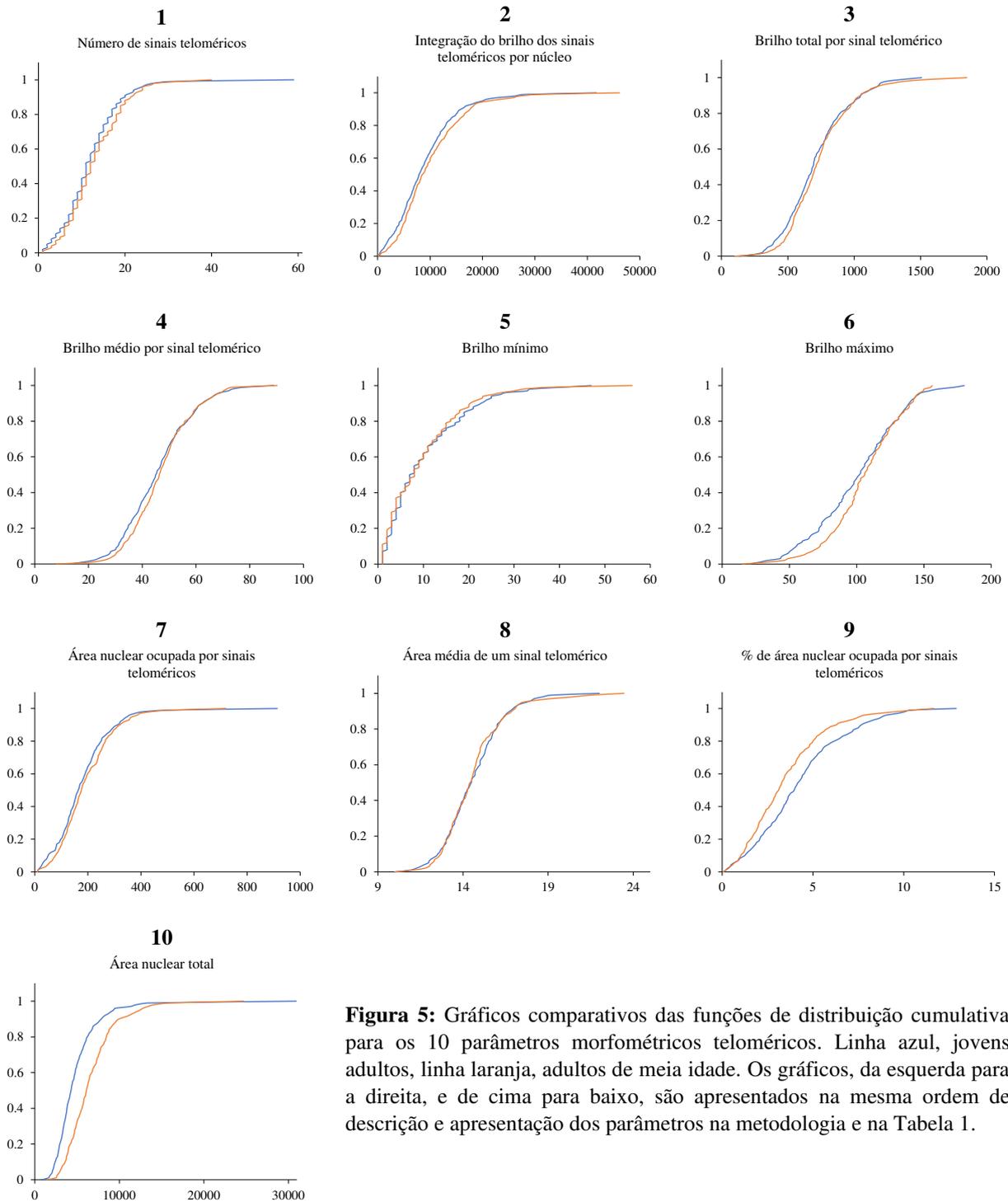


Figura 5: Gráficos comparativos das funções de distribuição cumulativa para os 10 parâmetros morfométricos teloméricos. Linha azul, jovens adultos, linha laranja, adultos de meia idade. Os gráficos, da esquerda para a direita, e de cima para baixo, são apresentados na mesma ordem de descrição e apresentação dos parâmetros na metodologia e na Tabela 1.

Tais diferenças podem ser mais precisamente observadas quando são avaliadas as diferenças na quantidade de núcleos de cada idade, organizadas graficamente após categorização dos resultados de cada parâmetro, seguida de normalização pelo número de observações em cada idade (Figura 6).

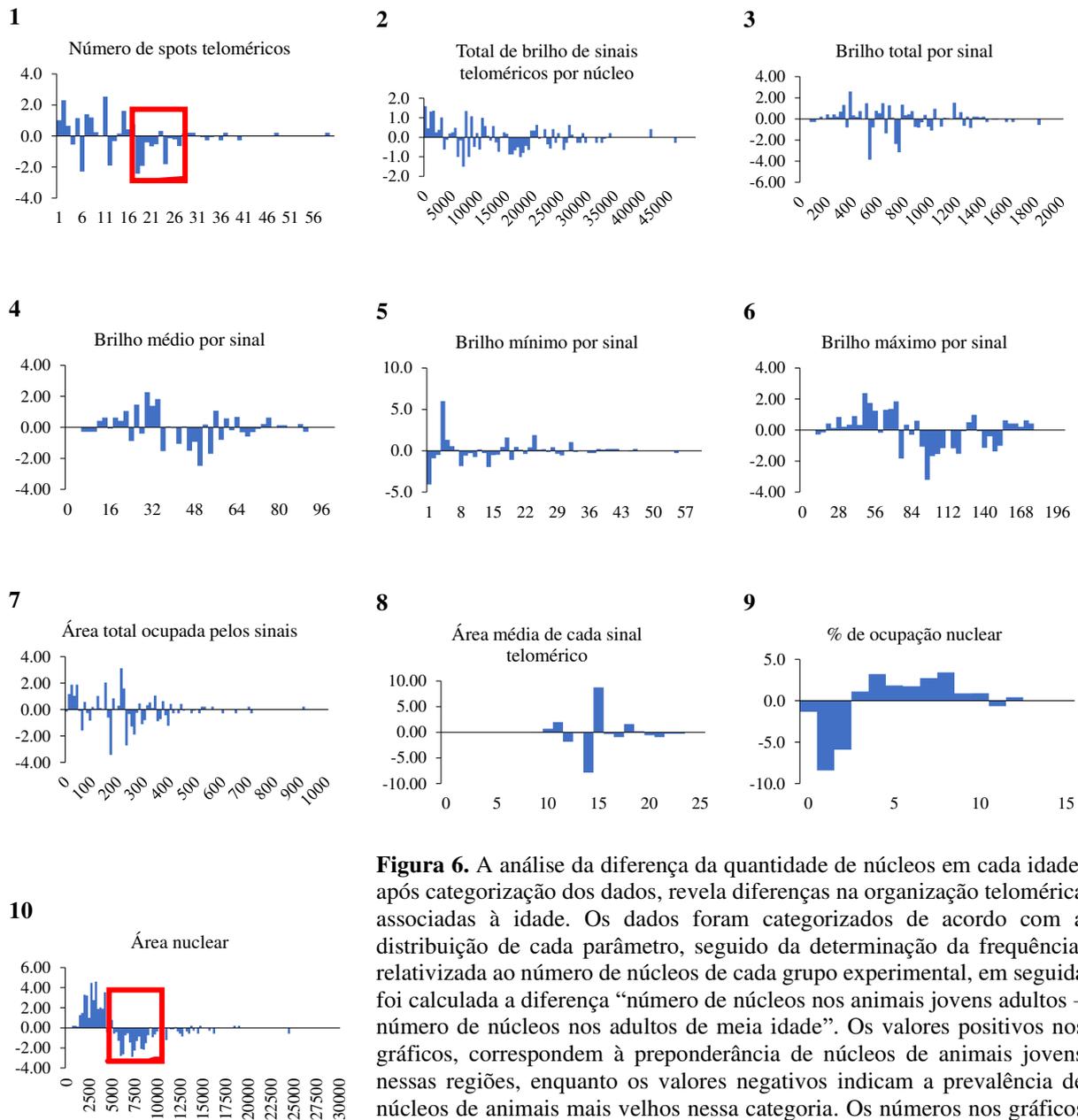


Figura 6. A análise da diferença da quantidade de núcleos em cada idade, após categorização dos dados, revela diferenças na organização telomérica associadas à idade. Os dados foram categorizados de acordo com a distribuição de cada parâmetro, seguido da determinação da frequência, relativizada ao número de núcleos de cada grupo experimental, em seguida foi calculada a diferença “número de núcleos nos animais jovens adultos – número de núcleos nos adultos de meia idade”. Os valores positivos nos gráficos, correspondem à preponderância de núcleos de animais jovens nessas regiões, enquanto os valores negativos indicam a prevalência de núcleos de animais mais velhos nessa categoria. Os números nos gráficos correspondem aos parâmetros descritos na metodologia. As regiões demarcadas em vermelho se referem aos núcleos abordados no texto.

A análise dos gráficos da Figura 6 permite, mais uma vez, evidenciar que o envelhecimento está associado com alterações teloméricas em neurônios de camundongos, mas

de forma sutil. A diferença mais clara que existe entre as duas idades, como já constatado nas análises anteriores, refere-se às maiores áreas nucleares nos animais mais velhos (figura 6, gráfico 10), que não é seguida por aumento proporcional de área nuclear ocupada por todos os sinais teloméricos (figura 6, gráfico 7), levando a uma diminuição do percentual de área nuclear ocupada por esses sinais nos adultos de meia idade (figura 6, gráfico 9). Em termos de área de cada sinal, os sinais teloméricos presentes nos núcleos de adultos de meia idade não diferem daqueles dos animais jovens (figura 6, gráfico 8). Por outro lado, núcleos com maior área nuclear absoluta ocupada por sinais teloméricos são mais frequentes em animais mais velhos (figura 6, gráfico 7), pelo menos na faixa entre 250 a 400 pixels. Tal diferença, é resultado direto de uma frequência maior de núcleos nessa faixa etária com maior número de sinais teloméricos (figura 6, gráfico 1) identificáveis pelas técnicas utilizadas no presente trabalho. Essa maior quantidade de sinais impacta, previsivelmente, em maior quantidade de brilho total medido para a somatória dos sinais encontrados num núcleo (figura 6, gráfico 2), sendo este, minimamente influenciado pelo brilho total de cada sinal (figura 6, gráfico 3), com uma predominância sutil de núcleos de adultos de meia idade nas regiões de maior valor, mas com considerável presença também de núcleos de jovens adultos na mesma região. Adicionalmente, enquanto os valores de brilho mínimo encontrados nos sinais teloméricos (figura 6, gráfico 5) praticamente não variam de acordo com a idade, é muito clara a predominância de núcleos de animais mais velhos nas regiões de valores maiores de brilho máximo (figura 6, gráfico 6) e conseqüentemente de brilho médio (figura 6, gráfico 4).

Com base nos resultados obtidos até o presente momento, foi levantada a seguinte pergunta "seria possível reunir diferentes características associadas a alguns núcleos de animais idosos (maior área nuclear, maior número de sinais teloméricos, maior intensidade de brilho total, médio e máximo) em um mesmo grupo nuclear?". Em outras palavras, nós questionamos se todas essas alterações ocorrem concomitantemente nos mesmos núcleos ou se essas

características estão associadas à idade, mas estando fragmentadas em populações nucleares distintas.

Considerando a faixa de áreas nucleares entre 5 mil e 10 mil pixels (Figura 6, gráfico 10, região demarcada em vermelho), por exemplo, temos que 32% da população nuclear de animais jovens se encontra nesta categoria, frente a 58% dos núcleos de adultos de meia idade (diferença de 27%), contribuindo substancialmente para o aumento de áreas nucleares associado à idade, observado no presente trabalho. Diante destes resultados, é possível pensar na questão, "que outras características esses núcleos possuem que ratificam aquelas até aqui associadas ao envelhecimento em neurônios de camundongos?"

A análise de correlação dos parâmetros mostra que as áreas nucleares se correlacionam muito fracamente com a maioria dos outros parâmetros de análise, sendo essa correlação, especificamente nos animais idosos sequer estatisticamente significativa ($p > 0,05$) para todas as demais comparações, exceto para aquela feita com a área nuclear ocupada por sinais teloméricos (Tabela 2, todas as comparações com o parâmetro 10). Sendo assim, os núcleos com as maiores áreas, observados mais frequentemente nos animais idosos, não são os responsáveis pelas alterações teloméricas evidenciadas pelos demais parâmetros.

Desse modo, optou-se em avaliar a co-ocorrência dos demais parâmetros no mesmo grupo de núcleos, considerando o número de sinais teloméricos por núcleo como filtro inicial. De acordo com a Tabela 2, tem-se que a quantidade de sinais se correlaciona fortemente com a somatória do brilho de todos os sinais, moderadamente com o brilho máximo observado, e fracamente com os brilhos total e médio por sinal (Tabela 2, comparações 1x2, 1x6, 1x3 e 1x4, respectivamente), sendo que essa correlação envolve todos os núcleos de cada idade.

Tabela 2. Análise correlacional dos parâmetros morfométricos teloméricos.

Correlação	Jovem		Meia idade	
	rho	p-valor	rho	p-valor
1x2	8,699E-01	2,200E-16	8,690E-01	2,200E-16
1x3	2,468E-01	5,197E-08	1,681E-01	1,653E-03
1x4	1,622E-01	3,915E-04	9,914E-02	6,470E-02
1x5	-4,880E-01	2,200E-16	-3,708E-01	8,759E-13
1x6	4,763E-01	2,200E-16	4,049E-01	3,686E-15
1x7	9,777E-01	2,200E-16	9,752E-01	2,200E-16
1x8	2,605E-01	8,660E-09	1,717E-01	1,298E-03
1x9	6,615E-01	2,200E-16	7,504E-01	2,200E-16
1x10	2,483E-01	4,321E-08	2,504E-02	6,416E-01
2x3	6,552E-01	2,200E-16	5,915E-01	2,200E-16
2x4	5,496E-01	2,200E-16	4,784E-01	2,200E-16
2x5	-3,046E-01	1,239E-11	-2,094E-01	8,305E-05
2x6	6,785E-01	2,200E-16	6,210E-01	2,200E-16
2x7	9,126E-01	2,200E-16	9,218E-01	2,200E-16
2x8	4,784E-01	2,200E-16	4,374E-01	2,200E-16
2x9	6,428E-01	2,200E-16	7,096E-01	2,200E-16
2x10	1,943E-01	2,053E-05	-2,747E-02	6,096E-01
3x4	9,190E-01	2,200E-16	8,615E-01	2,200E-16
3x5	1,267E-01	5,738E-03	1,534E-01	4,137E-03
3x6	6,805E-01	2,200E-16	6,243E-01	2,200E-16
3x7	3,475E-01	6,753E-15	2,908E-01	3,280E-08
3x8	5,764E-01	2,200E-16	6,519E-01	2,200E-16
3x9	2,963E-01	4,658E-11	2,251E-01	2,256E-05
3x10	-1,656E-02	7,191E-01	-2,214E-02	6,807E-01
4x5	2,454E-01	6,286E-08	3,120E-01	2,719E-09
4x6	6,601E-01	2,200E-16	5,862E-01	2,200E-16
4x7	2,091E-01	4,409E-06	1,533E-01	4,142E-03
4x8	2,677E-01	3,184E-09	2,740E-01	2,067E-07
4x9	1,586E-01	5,298E-04	1,292E-01	1,587E-02
4x10	-1,149E-02	8,030E-01	-4,843E-02	3,677E-01
5x6	-8,995E-02	5,034E-02	-2,107E-02	6,952E-01
5x7	-4,845E-01	2,200E-16	-3,555E-01	8,410E-12
5x8	-1,666E-01	2,703E-04	-1,101E-01	4,015E-02
5x9	-4,299E-01	2,200E-16	-3,369E-01	1,099E-10
5x10	-3,770E-02	4,128E-01	7,862E-02	1,433E-01
6x7	4,935E-01	2,200E-16	4,440E-01	2,200E-16
6x8	2,624E-01	6,680E-09	3,145E-01	1,984E-09
6x9	2,848E-01	2,680E-10	3,660E-01	1,804E-12
6x10	1,526E-01	8,558E-04	-5,817E-02	2,792E-01
7x8	4,273E-01	2,200E-16	3,462E-01	3,102E-11
7x9	7,129E-01	2,200E-16	7,668E-01	2,200E-16
7x10	2,077E-01	5,127E-06	-2,534E-02	6,376E-01
8x9	4,326E-01	2,200E-16	2,963E-01	1,748E-08
8x10	-6,886E-02	1,344E-01	-6,083E-02	2,578E-01
9x10	-4,712E-01	2,200E-16	-6,152E-01	2,200E-16

1. Número de sinais teloméricos por núcleo; 2. brilho total de sinais teloméricos por núcleo; 3. brilho total por sinal telomérico; 4. média de brilho dentro de cada sinal telomérico; 5. brilho mínimo em cada sinal; 6. brilho máximo em cada sinal; 7. área total ocupada pelos sinais dentro de um núcleo; 8. área média de cada sinal; 9. percentual de área nuclear ocupada pelos sinais teloméricos; 10. area nuclear total.

É interessante observar que o número de sinais teloméricos por núcleo também se correlaciona com o tamanho do núcleo nos jovens. Contudo, em animais de meia idade essa correlação é fraca e não significativa estatisticamente, mais uma vez demonstrando que os núcleos de maiores áreas, comuns nos idosos, não são os núcleos com mais sinais teloméricos. Entretanto, essa análise ainda considera os núcleos da população como um todo, não ficando claro se a correlação está presente à população nuclear como um todo, ou apenas com um grupo nuclear específico, cuja presença em animais mais velhos seja preponderante. Dessa forma, os núcleos foram estratificados, adotando como subpopulação os núcleos contendo entre 18 e 27 sinais identificados nas imagens (Figura 6, gráfico 1, região demarcada em vermelho), cuja frequência é maior nos adultos de meia idade. A partir da seleção desta população nuclear específica, o cálculo da medida de cada parâmetro morfométrico avaliado foi descrito comparando Jovens adultos e os adultos de meia idade.

A Tabela 3 portanto, apresenta os resultados das medianas de cada parâmetro de forma a comparar os núcleos contendo entre 18 e 27 sinais e os demais núcleos avaliados em cada grupo de animais.

Tabela 3. Análise comparativa da mediana dos núcleos com valores de sinais teloméricos entre 18 e 27, com os demais núcleos da população analisada.

		Jovens adultos									
Parâmetro	%	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Núcleos com 18-27 sinais	70	20	14980a	716a	44a	4a	115a	318a	15a	6a	5636a
Demais núcleos	10	6931b	681b	45a	8b	98b	149b	14a	4b	4098b	
		Adultos de meia idade									
Parâmetro	%	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Núcleos com 18-27 sinais	81	20	15061a	735a	47a	4a	118a	295a	15a	5a	6183a
Demais núcleos	10	7084b	697a	46a	9a	101b	150b	14a	3b	6082a	

1. Número de sinais teloméricos por núcleo; 2. brilho total de sinais teloméricos por núcleo; 3. brilho total por sinal telomérico; 4. média de brilho dentro de cada sinal telomérico; 5. brilho mínimo em cada sinal; 6. brilho máximo em cada sinal; 7. área total ocupada pelos sinais dentro de um núcleo; 8. área média de cada sinal; 9. percentual de área nuclear ocupada pelos sinais teloméricos; 10. área nuclear total. Os valores expressos são as medianas. Letras diferentes dentro da mesma idade para cada parâmetro indicam diferença estatística para $p < 0,05$ no teste Mann-Whitney.

Com os dados da Tabela 3, é possível constatar que os núcleos com 18-27 sinais nos grupos estudados apresentaram mais sinais teloméricos (parâmetro 1), cuja a mediana foi o dobro da mediana dos demais núcleos. Além disso, como esperado, os núcleos com 18-27 sinais apresentaram o dobro da área de ocupação dos sinais teloméricos somados por núcleo (parâmetro 7), com aumento proporcional no brilho total dos sinais somados (parâmetro 2). O tamanho médio de cada sinal (parâmetro 8) continuou não variando em função da idade ou do número de sinais teloméricos, assim como o brilho médio por sinal (parâmetro 4). Os níveis de brilho somados de todos os sinais por núcleo (parâmetro 3), e o valor máximo de brilho por sinal (parâmetro 6) tendem a ser maiores por uma pequena diferença nas medianas, nos núcleos com 18-27 sinais de animais jovens, sendo essa diferença mais expressiva no parâmetro de brilho total (parâmetro 3). Com valores de brilho máximo maiores, era esperado valores de brilho médio também maiores para cada sinal, mas a associação negativa entre o número de sinais teloméricos (parâmetro 1) e os valores mínimos de brilho dentro dos sinais (parâmetro 5), permite concluir que esses núcleos possuem sinais teloméricos com uma amplitude maior de níveis de luminância, ou seja, ao mesmo tempo que os núcleos com 18-27 sinais possuem pixels com mais brilho, possuem também áreas com brilho menos intenso do que os demais núcleos da população estudada, indicando a ocorrência de reorganização cromatínica nessas áreas, com reflexos na ligação e distribuição da sonda telomérica durante a técnica de FISH.

Alterações nas áreas dos sinais apontam para algum tipo de descompactação das regiões teloméricas, o que poderia trazer indícios acerca da origem dessa variação no brilho dos sinais. Entretanto, a pequena variação de áreas observadas (apenas 1 pixel para mais) nos sinais teloméricos de núcleos contendo entre 18 e 27 sinais teloméricos, não se configura em evidência que corrobore a conclusão de ocorrência de descompactação telomérica. Interessante constatar que nos animais jovens, núcleos com mais sinais teloméricos possuem áreas nucleares

visivelmente maiores, associação esta não encontrada nos adultos de meia idade, justamente a faixa etária caracterizada por uma maior frequência de núcleos com áreas maiores. De forma geral, as medianas dos parâmetros são bastante similares entre as idades, para esta subpopulação nuclear com mais sinais teloméricos, assim como o são também para os demais núcleos com menos sinais.

5. DISCUSSÃO

A hibridação *in situ* fluorescente (FISH – *Fluorescence In Situ Hybridization*) é uma técnica que permite a detecção de sequências gênicas e quantificação telomérica em um corte de tecido ou células. Caracterizada pela identificação e localização de sequências de ácidos nucléicos alvo, necessita da utilização de sequências complementares de DNA ou RNA clonados ou oligonucleotídeos sintéticos, em fita única, denominadas sondas, e escolhidos considerando especificidade, sensibilidade e facilidade de penetração no tecido. As sondas são marcadas com fluoróforos podendo, portanto, serem detectadas usando um microscópio fluorescente. A utilização de mais de um fluoróforo no mesmo material permite múltiplas identificações de alterações genéticas, como microdeleções, e rearranjos cromossômicos, através da observação de luz em diversas cores / comprimentos de onda. O uso de métodos computacionais como um sistema automatizado para análise, facilita a compreensão das amostras estudadas de forma que após a correção e nitidez do fundo, os sinais são reconhecidos com base em seu contraste, intensidade, área relativa ou absoluta e distância mínima para os outros sinais com a mesma cor, uma vez que o tamanho, a forma e a intensidade dos sinais podem diferir significativamente, ainda que dentro do mesmo núcleo. Outra característica importante da FISH é a possibilidade de obtenção de informações genômicas em núcleos interfásicos de forma rápida com um maior número de células, e maior precisão estatística sendo, portanto, a técnica ideal para análise de núcleos neuronais já que neurônios são células

pós-mitóticas e seu ciclo celular está interrompido em G0 (BAYANI; SQUIRE, 2004; MOTER; GÖBEL, 2000; PAJOR et al., 2012; SAVIC; BUBENDORF, 2016).

A arquitetura nuclear e a organização do DNA no núcleo interfásico têm atraído considerável interesse para revisões literárias. Há diversos trabalhos que justificam a aplicação da técnica de FISH para análise nuclear, especialmente modificações cromossômicas. Meeker e col. (2002) validaram uma técnica combinando FISH / imunofluorescência para comparação do comprimento dos telômeros permitindo a medição de comprimentos de telômeros utilizando técnicas de análise de imagem, contrariamente à avaliação molecular comumente utilizada. Sabe-se que a técnica de FISH é perfeitamente adequada para análise nuclear, apontando para diferenças significativas entre células individuais nas conformações da cromatina que podem resultar de vários estímulos, incluindo o estado celular e o estágio do ciclo celular (FRASER et al., 2015). Tem sido defendido que a FISH é um método confiável e sensível para detectar mudanças no tamanho dos telômeros no nível de uma única célula e para análise semiquantitativa dos comprimentos relativos de telômeros individuais, indicando que a

FISH em núcleos interfásicos e a análise de imagem digital são ferramentas úteis para estudar as diferenças teloméricas em populações raras de células não proliferativas (HENDERSON et al., 1996; LAUZON et al., 2000). Tais publicações sustentam a escolha do método de pesquisa do presente trabalho e a detecção das eventuais alterações.

Os dados do presente trabalho fornecem evidência de que alterações teloméricas podem ser encontradas em núcleos de neurônios, e que as células portadoras demonstradas aqui por mudanças em parâmetros morfométricos a partir da análise de imagem, são mais comuns em animais mais velhos, indicando uma possível alteração de organização telomérica associada ao envelhecimento. Diversos estudos disponíveis na literatura propõem que há perda de DNA telomérico de extremidades cromossômicas individuais durante o envelhecimento replicativo,

como o trabalho publicado por Henderson e col. (1996). Este grupo avaliou fibroblastos humanos pela técnica FISH e descreveu que apesar da existência de uma grande variabilidade na distribuição de pontos de hibridação maiores e menores dentro do volume nuclear após a FISH, discute-se, se tal fenômeno não está associado com diferenças na penetrabilidade da sonda dentro do núcleo, além da observação de que durante a interfase há uma diminuição na frequência de detecção de sinais, bem como uma diminuição da sua intensidade e tamanho durante o envelhecimento replicativo contribuindo para o encurtamento telomérico em fibroblastos. De forma diferente, no presente trabalho não foram observadas as mesmas alterações descritas no estudo de Henderson e col. (1996).

Vale ressaltar que as alterações teloméricas associadas com a idade em neurônios corticais não envolvem alterações de comprimento e, portanto, perda telomérica, mas sim alterações estruturais, que influenciam na forma como os telômeros estão organizados, o que é esperado, visto que, neurônios, como células pós-mitóticas, não estão sujeitas ao envelhecimento replicativo característico de células que proliferam. Entretanto, é possível que as alterações observadas sejam um reflexo não apenas de alterações teloméricas, mas sim na cromatina como um todo, abrangendo inclusive, os telômeros.

Nesse sentido, alterações cromatínicas associadas ao envelhecimento foram observadas em diversos tipos celulares e diferentes espécies, por exemplo espermatozoides de bovinos (KIPPER, 2014) e de galos (RODRIGUES; ROCHA; BELETTI, 2009), nos quais há mudanças tanto na homogeneidade como na intensidade de compactação cromatínicas com a idade, acompanhadas de alterações de volume nuclear, assim como em neurônios de camundongos (Rodrigues et al., 2014; Oliveira, 2019), onde se propõe que a descompactação cromatínica associada à idade esteja relacionada com perdas heterocromáticas, sendo essa observada em outros modelos (BURGESS; MISTELI; OBERDOERFFER, 2012). A descompactação

cromatínica tem sido um aspecto comum observado nos modelos com a idade (PARK et al., 2017). Adicionalmente, tais alterações na cromatina resultam em aumento da instabilidade genômica e aumento do dano ao DNA; desgaste de telômeros; alterações epigenéticas; redução global de histonas e alteração de variantes (D'AVILA et al., 2020).

Dessa forma, as diferenças encontradas no presente trabalho, decorrentes das análises dos sinais teloméricos de núcleos de neurônios de camundongos de diferentes idades se justificam na tese de que os núcleos de neurônios de animais mais velhos apresentam descompactação e reorganização cromatínicas, estando esta, mais difusa dentro de um volume nuclear maior, mas não necessariamente, neste caso em específico, uma vez que o tamanho dos núcleos avaliados não pareceu estar associado com as demais alterações morfológicas observadas, pelo menos com relação aos animais mais velhos.

6. CONCLUSÃO

A partir dos dados coletados no presente trabalho a partir da análise morfométrica de sinais teloméricos, concluímos que os núcleos de neurônios corticais de camundongos mais velhos não apresentam perda ou degradação telomérica com o envelhecimento, mas sim, um processo de descompactação e reorganização cromatínicas, com impactos na organização telomérica visto que não foi observado diferenças significativas nos parâmetros avaliados com exceção da área telomérica.

7. REFERÊNCIAS

- ARMANIOS, M. Syndromes of Telomere Shortening. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, v. 10, n. 1, p. 45–61, set. 2009.
- AUBERT, G.; LANSDORP, P. M. Telomeres and Aging. *Physio Rev*, v. 88, p. 23, 2008.
- BALCOMBE, N. R.; SINCLAIR, A. Ageing: definitions, mechanisms and the magnitude of the problem. *Best Practice e Research Clinical Gastroenterology*, v. 15, n. 6, p. 835–849, Dez. 2001.

- BARRETO, Tiago Manuel Carvalheiro. Fisiopatologia do envelhecimento cerebral e mecanismos anti-aging. 2020. Tese de Doutorado.
- BAYANI, J.; SQUIRE, J. A. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH). *Current Protocols in Cell Biology*, v. 23, n. 1, jun. 2004.
- BAYLIS, D. et al. Inflammation, Telomere Length, and Grip Strength: A 10-year Longitudinal Study. *Calcified Tissue International*, v. 95, n. 1, p. 54–63, Jul. 2014.
- BODNAR, A. G. Extension of Life-Span by Introduction of Telomerase into Normal Human Cells. *Science*, v. 279, n. 5349, p. 349–352, 16 Jan. 1998.
- BURGESS, R. C.; MISTELI, T.; OBERDOERFFER, P. DNA damage, chromatin, and transcription: the trinity of aging. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 24, n. 6, p. 724–730, Dez. 2012.
- CALCINOTTO, A. et al. Cellular Senescence: Aging, Cancer, and Injury. *Physiological Reviews*, v. 99, n. 2, p. 1047–1078, 1 abr. 2019.
- CANCELA, D. M. G. O processo de envelhecimento. Trabalho realizado no Estágio de Complemento ao Diploma de Licenciatura em Psicologia pela Universidade Lusfada do Porto, v. 3, 2007. Acessado em: janeiro, 2022. Disponível em: <https://www.psicologia.pt/artigos/textos/TL0097.pdf>
- CELLI, G. B.; DE LANGE, T. DNA processing is not required for ATM-mediated telomere damage response after TRF2 deletion. *Nature Cell Biology*, v. 7, n. 7, p. 712–718, Jul. 2005.
- CHAN, S. R. W. L.; BLACKBURN, E. H. Telomeres and telomerase. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, v. 359, n. 1441, p. 109–122, 29 Jan. 2004.
- COTTLIAR, A. S. H.; SLAVUTSKY, I. R. TELOMEROS Y ACTIVIDAD DE TELOMERASA: SU PARTICIPACION EN EL ENVEJECIMIENTO Y EL DESARROLLO NEOPLASICO. p. 8, 2001.
- CZEPIELEWSKI, L. S. et al. Telomere Length and CCL11 Levels are Associated With Gray Matter Volume and Episodic Memory Performance in Schizophrenia: Evidence of Pathological Accelerated Aging. *Schizophrenia Bulletin*, v. 44, n. 1, p. 158–167, 13 Jan. 2018.
- D’AVILA, J. D. C. et al. Mecanismos moleculares do envelhecimento: revisão da literatura. *Revista Brasileira de Ciências do Envelhecimento Humano*, v. 17, n. 1, 19 jun. 2020.
- DA SILVEIRA, M. M. et al. Envelhecimento humano e as alterações na postura corporal do idoso. *Revista de Atenção à Saúde (ISSN 2359-4330)*, v. 8, n. 26, 2010.
- DÂNGELO, J. G.; FATTINI, C. A. Anatomia humana sistêmica e segmentar: para o estudante de medicina. [s.l.] Atheneu, 1998.
- DEY, A.; CHAKRABARTI, K. Current Perspectives of Telomerase Structure and Function in Eukaryotes with Emerging Views on Telomerase in Human Parasites. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 2, p. 333, 24 Jan. 2018.
- DIAS, B. B. et al. Aplicação da Escala de Equilíbrio de Berg para verificação do equilíbrio de idosos em diferentes fases do envelhecimento. *Revista Brasileira de Ciências do Envelhecimento Humano*, v. 6, n. 2, p. 213–224, 2009.
- DRAGANSKI, B.; LUTTI, A.; KHERIF, F. Impact of brain aging and neurodegeneration on cognition: evidence from MRI. *Current Opinion in Neurology*, v. 26, n. 6, p. 640–645, Dez. 2013.
- FRASER, J. et al. An Overview of Genome Organization and How We Got There: from FISH to Hi-C. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 79, n. 3, p. 347–372, set. 2015.
- FREITAS, J. O. F.; AGUIAR, C. R. R. A. DE. Avaliação das funções cognitivas de atenção, memória e percepção em pacientes com esclerose múltipla. *Psicologia: Reflexão e Crítica*, v. 25, n. 3, p. 457–466, 2012.

GAVA, A. A.; ZANONI, J. N. ENVELHECIMENTO CELULAR. p. 6, 2005.

GORELICK, P. B. et al. Vascular Contributions to Cognitive Impairment and Dementia: A Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*, v. 42, n. 9, p. 2672–2713, set. 2011.

HALL, J. E.; AC, G. Contribuições do cerebelo e dos núcleos da base para o controle motor geral. *Tratado de fisiologia médica*. 12a edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 719–34, 2011.

HAYFLICK, L. Living forever and dying in the attempt. *Experimental Gerontology*, v. 38, n. 11–12, p. 1231–1241, nov. 2003.

HENDERSON, S. et al. In situ analysis of changes in telomere size during replicative aging and cell transformation. *Journal of Cell Biology*, v. 134, n. 1, p. 1–12, 1 jul. 1996.

HERNÁNDEZ FERNÁNDEZ, Rolando A. Telómeros y telomerasas. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, v. 18, n. 2, p. 121-129, 1999.

HIYAMA, E.; HIYAMA, K. Telomere and telomerase in stem cells. *British Journal of Cancer*, v. 96, n. 7, p. 1020–1024, abr. 2007.

JACOME BURBANO, M. S.; GILSON, E. Long-lived post-mitotic cell aging: is a telomere clock at play? *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 189, p. 111256, Jul. 2020.

JARDIM, Laura Bannach; ASHTON-PROLLA, Patrícia; MALUF, Sharbel Weidner. O Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina de 2009: O Papel dos Telómeros e da Telomerase na Manutenção dos Cromossomos. *Clinical e Biomedical Research*, v. 29, n. 3, 2009.

KAWAMOTO, E. E. Anatomia e fisiologia humana. In: *Anatomia e fisiologia humana*. [s.l.: s.n.]. p. 1898–1898.

KIPPER, B. H. MORFOMETRIA E COMPACTAÇÃO DA CROMATINA ESPERMÁTICA DE TOUROS NELORE DE ACORDO COM A IDADE E SUA INFLUÊNCIA NA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES. *in vitro*, p. 73, 2014.

KONG, C. M.; LEE, X. W.; WANG, X. Telomere shortening in human diseases. *FEBS Journal*, v. 280, n. 14, p. 3180–3193, jul. 2013.

LAUZON, W. et al. Flow cytometric measurement of telomere length. *Cytometry*, v. 42, n. 3, p. 159–164, 15 jun. 2000.

LIBERTINI, G. Telomere-Subtelomere-Telomerase System. In: GU, D.; DUPRE, M. E (Eds.). *Encyclopedia of Gerontology and Population Aging*. Cham: Springer International Publishing, 2019. p. 1–11.

LIBERTINI, Giacinto. The role of telomere-telomerase system in age-related fitness decline, a tameable process. *Telomeres: Function, shortening and lengthening*, p. 77, 2009.

LINDQVIST, D. et al. Psychiatric disorders and leukocyte telomere length: Underlying mechanisms linking mental illness with cellular aging. *Neuroscience e Biobehavioral Reviews*, v. 55, p. 333–364, ago. 2015.

LITTIG, C. G. M.; ALMEIDA, N. M. D. CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE CURSO DE GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA. p. 19, 2020.

M.STANSEL, R. T-loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 3' telomeric overhang. *The EMBO Journal*, v. 20, n. 19, p. 5532–5540, 1 out. 2001.

MACHADO, A. B. M (2007). *Neuroanatomia Funcional*. Segunda edição. Editora Atheneu, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

MARIEB, E. N.; HOEHN, K. *Anatomia e fisiologia*. [s.l.] Artmed Editora, 2009.

- MASON, P. J.; PERDIGONES, N. Telomere biology and translational research. *Translational Research*, v. 162, n. 6, p. 333–342, Dez. 2013.
- MATTSON, M. P.; MAGNUS, T. Ageing and neuronal vulnerability. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 7, n. 4, p. 278–294, abr. 2006.
- MEEKER, A. K. et al. Telomere Length Assessment in Human Archival Tissues. *The American Journal of Pathology*, v. 160, n. 4, p. 1259–1268, abr. 2002.
- MOTER, A.; GÖBEL, U. B. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, v. 41, n. 2, p. 85–112, jul. 2000.
- NERI, A. L. Desenvolvimento e envelhecimento. [s.l.] Papirus Editora, 2001.
- NETTO, Matheus Papaléo. Gerontologia: a velhice e o envelhecimento em visão globalizada. In: *Gerontologia: a velhice e o envelhecimento em visão globalizada*. 2002. p. 524-524.
- NORDON, David Gonçalves et al. Perda cognitiva em idosos. *Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba*, v. 11, n. 3, p. 5-8, 2009.
- O’SULLIVAN, R. J.; KARLSEDER, J. Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 11, n. 3, p. 171–181, mar. 2010.
- OZTURK, M.; LI, Y.; TERGAONKAR, V. Current Insights to Regulation and Role of Telomerase in Human Diseases. *Antioxidants*, v. 6, n. 1, p. 17, 28 Fev. 2017.
- PAJOR, G. et al. State-of-the-art FISHing: Automated analysis of cytogenetic aberrations in interphase nuclei. *Cytometry Part A*, v. 81A, n. 8, p. 649–663, ago. 2012.
- PARK, M. et al. Age-associated chromatin relaxation is enhanced in Huntington’s disease mice. *Aging*, v. 9, n. 3, p. 803–822, 12 mar. 2017.
- PARSONS, H. A. TELÔMEROS, TELOMERASE E CÂNCER. *Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba*, v. 5, n. 1, p. 6, 2003.
- PASSERINO, L. M.; PASQUALOTTI, P. R. A inclusão digital como prática social: uma visão sócio-histórica da apropriação tecnológica em idosos. *Envelhecimento Humano: Saberes e Fazeres*. Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, p. 246–260, 2006.
- PASSOS, J. F. et al. Cellular senescence: unravelling complexity. *AGE*, v. 31, n. 4, p. 353–363, Dez. 2009.
- PEREIRA JUNIOR, J. Estudo dos telômeros em tecido hipocampal de camundongos submetidos a um estresse psicossocial prolongado. *Mestrado em Psiquiatria—São Paulo: Universidade de São Paulo*, 11 dez. 2008.
- PEREIRA, Telmo. A função cognitiva no envelhecimento. *Abordagem geriátrica ampla na promoção de um envelhecimento ativo e saudável: componentes do modelo de intervenção AGA@ 4life*, n. 1, p. 179-194, 2019.
- PERETZ, C. et al. Computer-Based, Personalized Cognitive Training versus Classical Computer Games: A Randomized Double-Blind Prospective Trial of Cognitive Stimulation. *Neuroepidemiology*, v. 36, n. 2, p. 91–99, 2011.
- POLHO, G. B. et al. Leukocyte telomere length in patients with schizophrenia: A meta- analysis. *Schizophrenia Research*, v. 165, n. 2–3, p. 195–200, Jul. 2015.
- PREISS, M. et al. Personalized Cognitive Training in Unipolar and Bipolar Disorder: A Study of Cognitive Functioning. *Frontiers in Human Neuroscience*, v. 7, 2013.
- REUTER-LORENZ, P. A.; PARK, D. C. How Does it STAC Up? Revisiting the Scaffolding Theory of Aging

and Cognition. *Neuropsychology Review*, v. 24, n. 3, p. 355–370, set. 2014.

REUTER-LORENZ, P. A.; SYLVESTER, C. Y. C. *Cognitive neuroscience of aging: Linking cognitive and cerebral aging*. [s.l.] Oxford University Press New York, NY, USA: 2005.

RODRIGUES, A. C. N.; ROCHA, J. V.; BELETTI, M. E. Análise computacional da compactação da cromatina de espermatozoides de galo. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 61, n. 6, p. 1302–1307, dez. 2009.

RODRIGUES, H. F. UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA. p. 42, 2013.

RUBIN, H. Cell aging in vivo and in vitro. *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 98, n. 1, p. 1– 35, out. 1997.

SANDERS, J. L.; NEWMAN, A. B. Telomere Length in Epidemiology: A Biomarker of Aging, Age- Related Disease, Both, or Neither? *Epidemiologic Reviews*, v. 35, n. 1, p. 112–131, 1 jan. 2013.

SANTOS, F. H. DOS; ANDRADE, V. M.; BUENO, O. F. A. Envelhecimento: um processo multifatorial. *Psicologia em Estudo*, v. 14, n. 1, p. 3–10, mar. 2009.

SANTOS, S. S. C. Concepções teórico-filosóficas sobre envelhecimento, velhice, idoso e enfermagem gerontogeriatrica. *Revista Brasileira de Enfermagem*, v. 63, n. 6, p. 1035–1039, Dez. 2010.

SAVIC, S.; BUBENDORF, L. Common Fluorescence In Situ Hybridization Applications in Cytology. *Archives of Pathology e Laboratory Medicine*, v. 140, n. 12, p. 1323–1330, 1 Dez. 2016.

SCHAAL, C.; PILLAI, S.; CHELLAPPAN, S. P. The Rb–E2F Transcriptional Regulatory Pathway in Tumor Angiogenesis and Metastasis. In: *Advances in Cancer Research*. [s.l.] Elsevier, 2014. v. 121p. 147–182.

SERRANO, F.; KLANN, E. Reactive oxygen species and synaptic plasticity in the aging hippocampus. *Ageing Research Reviews*, v. 3, n. 4, p. 431–443, Nov. 2004.

SHATIL, E. Does combined cognitive training and physical activity training enhance cognitive abilities more than either alone? A four-condition randomized controlled trial among healthy older adults. *Frontiers in Aging Neuroscience*, v. 5, 2013.

SHIN, D.-M.; KUCIA, M.; RATAJCZAK, M. Z. Nuclear and Chromatin Reorganization during Cell Senescence and Aging – A Mini-Review. *Gerontology*, v. 57, n. 1, p. 76–84, 2011.

SIKORA, E.; BIELAK-ZMIJEWSKA, A.; MOSIENIAK, G. What is and what is not cell senescence. *Postępy Biochemii*, p. 9, 2018.

SIKORA, Ewa et al. Impact of cellular senescence signature on ageing research. *Ageing research reviews*, v. 10, n. 1, p. 146-152, 2011. *Reviews*, v. 10, n. 1, p. 146–152, Jan. 2011.

SOUSOUNIS, K.; BADDOUR, J. A.; TSONIS, P. A. Aging and Regeneration in Vertebrates. In: *Current Topics in Developmental Biology*. [s.l.] Elsevier, 2014. v. 108p. 217–246.

TAM, H. M. K. et al. Age-Related Difference in Relationships Between Cognitive Processing Speed and General Cognitive Status. *Applied Neuropsychology: Adult*, v. 22, n. 2, p. 94–99, 4 mar. 2015.

TASSO, Carine de Araújo Miranda. *Ataxia-telangiectasia mutada (ATM) e sua correlação com a incidência de neoplasias: uma revisão sistemática*. 2017.

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

TORTORA, G. J.; DERRICKSON, B. *Corpo Humano-: Fundamentos de Anatomia e Fisiologia*. [s.l.] Artmed Editora, 2016.

- TOSATO, Matteo et al. The aging process and potential interventions to extend life expectancy. *Clinical interventions in aging*, v. 2, n. 3, p. 401, 2007.
- UYAR, B. et al. Single-cell analyses of aging, inflammation and senescence. *Ageing Research Reviews*, v. 64, p. 101156, Dez. 2020.
- VENKATESAN, S.; KHAW, A.; HANDE, M. Telomere Biology—Insights into an Intriguing Phenomenon. *Cells*, v. 6, n. 2, p. 15, 19 jun. 2017.
- VERDUN, R. E.; KARLSEDER, J. Replication and protection of telomeres. *Nature*, v. 447, n. 7147, p. 924–931, jun. 2007.
- VICTORELLI, S.; PASSOS, J. F. Telomeres and Cell Senescence - Size Matters Not. *EBioMedicine*, v. 21, p. 14–20, Jul. 2017.
- VON ZGLINICKI, T. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 27, n. 7, p. 339–344, Jul. 2002.
- WAGNER, K.-H. et al. Biomarkers of Aging: From Function to Molecular Biology. *Nutrients*, v. 8, n. 6, p. 338, 2 jun. 2016.
- WILLIAMS, Kandace; SOBOL, Robert W. Mutation research/fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis special issue: DNA repair and genetic instability. *Mutation research*, p. 1, 2013.
- ZHU, Y. et al. Telomere and its role in the aging pathways: telomere shortening, cell senescence and mitochondria dysfunction. *Biogerontology*, v. 20, n. 1, p. 1–16, Fev. 2019.