



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**RAYANNE FERREIRA AYRES**

**BUSCA DE BIOMARCADORES EM LONGEVIDADE HUMANA:  
INVESTIGAÇÃO DOS GENES *MTHFD1L* E *SERPINA3***

VITÓRIA, ES

2019

RAYANNE FERREIRA AYRES

**BUSCA DE BIOMARCADORES EM LONGEVIDADE HUMANA:  
INVESTIGAÇÃO DOS GENES *MTHFD1L* E *SERPINA3***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Flávia de Paula

VITÓRIA, ES

2019

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

---

A985b Ayres, Rayanne Ferreira, 1989-  
Busca de biomarcadores em longevidade humana: :  
Investigação dos genes MTHFD1L e SERPINA3 / Rayanne  
Ferreira Ayres. - 2019.  
43 f. : il.

Orientadora: Flavia de Paula.  
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade  
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Biomarcador. 2. Genética. 3. Longevidade humana. 4.  
Biotecnologia. I. Paula, Flavia de. II. Universidade Federal do  
Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

---



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

---

**"BUSCA DE BIOMARCADORES EM LONGEVIDADE HUMANA:  
INVESTIGAÇÃO DOS GENES *MTHFD1L* E *SERPINA3*"**

Rayanne Ferreira Ayres

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovado por:

\_\_\_\_\_  
Profa. Dra Flavia de Paula (UFES)  
Orientadora

\_\_\_\_\_  
Profa. Dra Flávia Imbroisi Valle Errera (UFES)  
Membro Interno

\_\_\_\_\_  
Profa. Dra Gerarda Gillian Silva Sena (UFES)  
Membro Interno

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Michel Satya Naslavsky (USP)  
Membro Externo – Participação Remota

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba (UFJF)  
Membro Externo – Participação Remota

Vitória - ES, 25 de fevereiro de 2019.

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Pedro e Rosimeri, e aos meus companheiros de aventuras, Marcos  
Vinicius, Dayanne e Costhelynha.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pois sem sua luz seria impossível. Fez-me resiliente nos momentos de frustração e dificuldade.

Agradeço aos meus pais, Pedro e Rosimeri, pelo amor, apoio e suporte para que eu pudesse realizar este trabalho.

Ao meu noivo, Marcos Vinicius, por me acalmar e mostrar que com paciência tudo se resolveria e daria certo.

À minha irmã, Dayanne, por me incentivar a fazer o meu melhor mesmo nos momentos de angústia.

À minha amiga, Juliana Trindade, que ouviu meus desabafos nos momentos de tensão e ansiedade e pelas palavras reconfortantes.

Aos meus companheiros de quatro patas, Costhelynha, Mimi e Frida, que com apenas o olhar me auxiliaram nos momentos de ansiedade.

Ao Núcleo de Genética Humana e Molecular (NGHM) e meus colegas de laboratório pela amizade e apoio.

A professora Lúcia Helena Sagrillo Pimassoni pela paciência e apoio na análise estatística deste trabalho.

Ao grupo da Longevidade Humana, Marcela, Matheus, Isadora e prof<sup>a</sup> Gilian, pela disponibilidade em me ajudar e incentivar o nosso trabalho.

À Professora Flávia de Paula, pelo seu carinho, respeito e paciência. Além de ser uma pessoa maravilhosa, demonstrou-se uma excelente orientadora. Obrigada!

À UFES e ao PPGBiotec pelo acolhimento e a CAPES pelo apoio financeiro.

Agradeço também as seguintes instituições que forneceram suporte financeiro para realização deste trabalho: UFES, FACITEC, MCTI/CNPQ/MEC/CAPES e CNPQ/MS-Decit/SESA/FAPES.

*“A felicidade pode ser encontrada mesmo nas horas mais difíceis, se você lembrar de acender a luz”. (Alvo Dumbledore)*

## RESUMO

AYRES, R.F. **Busca de biomarcadores em longevidade humana: investigação dos genes *MTHFD1L* e *SERPINA3***. 2019. 43f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo. Brasil.

A longevidade humana, tempo que excede a expectativa média de vida da população, é uma característica multifatorial determinada por fatores ambientais e de predisposição genética. Apesar de vários estudos investigarem a influência de componentes ambientais na longevidade, o papel de variantes genéticas nesta característica ainda não está bem esclarecido. Genes que participam do metabolismo de aminoácidos e genes que atuam em processos inflamatórios, como os genes *MTHFD1L* e *SERPINA3*, respectivamente, poderiam influenciar nas variações de tempo de vida de indivíduos de uma população. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar se existe associação dos polimorfismos de *MTHFD1L* (rs11754661) e *SERPINA3* (rs4934) com a longevidade humana em indivíduos atendidos em um hospital de referência no atendimento de geriatria da Grande Vitória-ES, Brasil. Foram selecionados 436 participantes, divididos em grupos de longevos (acima de 85 anos) e idosos com idade próxima a expectativa de vida da população (entre 70 e 75 anos). A genotipagem foi realizada por PCR em tempo real e os polimorfismos identificados estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. As análises estatísticas foram realizadas por meio dos testes de *Odds Ratio* (OR) com Intervalo de Confiança de 95%,  $\chi^2$  e Fisher, com *p-value*  $\leq 0,05$ . Não foi observada associação do polimorfismo rs4934 do gene *SERPINA3* com a longevidade. Todavia, o alelo G do polimorfismo rs11754661 do gene *MTHFD1L* se comportou como um alelo de risco para a longevidade humana na população analisada ( $p=0,027$ ; OR=1,976; IC 95% variando de 1,080 a 3,616), bem como o genótipo GG ( $p=0,030$ ; OR=2,006; IC 95% variando de 1,070-3,761), enquanto que o genótipo AG atuou como fator de proteção ( $p=0,041$ ; OR=0,518; IC 95% variando de 0,275 a 0,974). Os resultados sugerem que o polimorfismo rs11754661 do gene *MTHFD1L* está associado com a longevidade humana na amostra de indivíduos da Grande Vitória-ES, Brasil e que o polimorfismo rs4934 do gene *SERPINA3* não está associado com longevidade na amostra avaliada.

Palavras-chave: Tempo de vida. Polimorfismo genético. Gene *MTHFD1L*. gene *SERPINA3*.



## ABSTRACT

AYRES, R.F. Search for biomarkers in human longevity: investigation of the genes *MTHFD1L* and *SERPINA3*. 2019. 43f. Dissertation (Master in Biotechnology) - Postgraduation Biotechnological Programme, UFES, Espírito Santo. Brazil.

Human longevity, which exceeds the average life expectancy of the population, is a multifactorial characteristic determined by environmental factors and genetic predisposition. Although several studies investigate the influence of environmental components on longevity, the role of genetic variants in this trait is still unclear. Genes that participate in the metabolism of amino acids and genes that act in inflammatory processes, such as the genes *MTHFD1L* and *SERPINA3*, respectively, could influence the variations of the life span of individuals of a population. Thus, this study aimed to evaluate whether there is an association between the polymorphisms of *MTHFD1L* (rs11754661) and *SERPINA3* (rs4934) with human longevity in individuals attended at a referral hospital in Geriatrics in Grande Vitória-ES, Brazil. A total of 436 participants were selected, divided into long-lived groups (over 85 years old) and elderly people close to the life expectancy of the population (between 70 and 75 years). Genotyping was performed by real-time PCR and the identified polymorphisms were in Hardy-Weinberg equilibrium. Statistical analyzes were performed using Odds Ratio (OR) tests with Confidence Interval of 95%,  $\chi^2$  and Fisher, with p-value  $\leq 0.05$ . No association of the rs4934 polymorphism of the *SERPINA3* gene with longevity was observed. However, the G allele of polymorphism rs11754661 of the *MTHFD1L* gene behaved as a risk allele for human longevity in the analyzed population (p = 0.027, OR = 1.976, 95% CI ranging from 1.080 to 3.616), as well as the GG genotype P = 0.030, OR = 2.006, 95% CI ranging from 1.070-3.761), whereas the AG genotype served as a protection factor (p = 0.041, OR = 0.518, 95% CI ranging from 0.275 to 0.974). The results suggest that the polymorphism rs11754661 of the *MTHFD1L* gene is associated with human longevity in the sample of individuals from Grande Vitória-ES, Brazil and that the rs4934 polymorphism of the *SERPINA3* gene is not associated with longevity in the sample evaluated.

Keywords: Life time. Genetic polymorphism. *MTHFD1L* gene. *SERPINA3* gene.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. O envelhecimento e o surgimento de doenças . . . . .	14
Figura 2. Projeção para a população brasileira em milhões para os anos de 2050 e 2100 comparados com os anos de 1950 e 2017.....	16
Figura 3. Localização do gene <i>MTHFD1L</i> no cromossomo 6.....	21
Figura 4. Esquema simplificado do metabolismo do folato nas mitocôndrias e no citoplasma .....	21
Figura 5. Localização do gene <i>SERPINA3</i> no cromossomo 14 .....	23

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados referentes ao gênero e etnia dos participantes da amostra.....	27
Tabela 2. Relação dos <i>primers</i> utilizados para o estudo dos genes <i>SERPINA3</i> e <i>MTHFD1L</i> .....	27
Tabela 3. Condições para a PCR convencional para sequenciamento.....	30
Tabela 4. Frequência de genótipos e alelos do polimorfismo rs11754661 do gene <i>MTHFD1L</i> numa população de longevos e controles da Grande Vitória, ES.....	31
Tabela 5. Frequência de genótipos e alelos do polimorfismo rs4934 do gene <i>SERPINA3</i> numa população de longevos e controles da Grande Vitória, ES.....	33

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu$ l	Microlitros
$^{\circ}$ C	Graus Celsius
<i>APOE</i>	Apolipoproteína E
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	Desoxirribonucleotideo trifosfato
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
EHW	Equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i>
<i>FOXO3</i>	<i>Forkhead box O3</i>
HSCMV	Hospital Santa Casa de Misericórdia
Min	Minutos
mM	Milimolar
<i>MTHFD1L</i>	Gene metilenetetrahydrofolato desidrogenase (NADP+ dependent) 1 like
Ng	Nanograma
OMS	Organização Mundial da Saúde
Pb	Pares de Base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
s	Segundos

*SERPINA3* Gene da proteína Serpina3, anteriormente conhecido também como  $\alpha$ 1-Antichimotripsina ( $\alpha$ 1-ACT)

SNP Polimorfismo de nucleotídeo único (do inglês *Single Nucleotide Polymorphisms*)

SNV Variante de um único nucleotídeo (do inglês *Single Nucleotide Variant*)

TBE Tampão tris/borato/EDTA

TCLE Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TEMED Tetrametiletilenodiamina

UFES Universidade Federal do Espírito Santo

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
1.1	AS CARACTERÍSTICAS E FATORES RELACIONADOS AO ENVELHECIMENTO	14
1.1.1	<b>Envelhecimento no Brasil</b>	<b>15</b>
1.2	A LONGEVIDADE HUMANA E FATORES	17
1.3	POLIMORFISMOS GENÉTICOS POTENCIAIS ASSOCIADOS A LONGEVIDADE HUMANA: FUNÇÕES E IMPLICAÇÕES	19
1.3.1	<b>Gene <i>MTHFD1L</i></b>	<b>20</b>
1.3.2	<b>Gene <i>SERPINA3</i></b>	<b>22</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>24</b>
2.1	OBJETIVO GERAL	24
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>25</b>
3.1	AMOSTRA	25
3.2	COLETA DE SANGUE E EXTRAÇÃO DE DNA	27
3.3	PCR E SEQUENCIAMENTO DOS GENES <i>MTHFD1L</i> E <i>SERPINA3</i>	26
3.3.1	<b>Sequenciamento de Sanger</b>	<b>27</b>
3.2	GENOTIPAGEM DO GENES <i>SERPINA3</i> e <i>MTHFD1L</i>	28
3.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>31</b>
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>36</b>
	REFERÊNCIAS	37
	ANEXOS	42

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 AS CARACTERÍSTICAS E FATORES RELACIONADOS AO ENVELHECIMENTO

O envelhecimento é um fenômeno global e que ocorre de maneira natural entre os seres vivos, característica quase universal dos organismos multicelulares (HUGHES; REYNOLDS, 2005).

Biologicamente, o envelhecimento se caracteriza por danos celulares e moleculares que são acumulados ao longo do tempo (WORLD HEALTH ORGANIZATION et al, 2005). Assim, é comum no processo de envelhecimento, nos seres humanos, ocorrer prejuízo no controle da homeostase orgânica, com diminuição na eficiência de diversas funções fisiológicas (VIÑA; BORRÁS; MIQUEL, 2007). Com o avanço da idade, torna-se mais frequente o aparecimento de doenças crônico-degenerativas (Figura 1) como diabetes, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, câncer, doenças renais e cardíacas, entre outras (KAEBERLEIN, 2016).

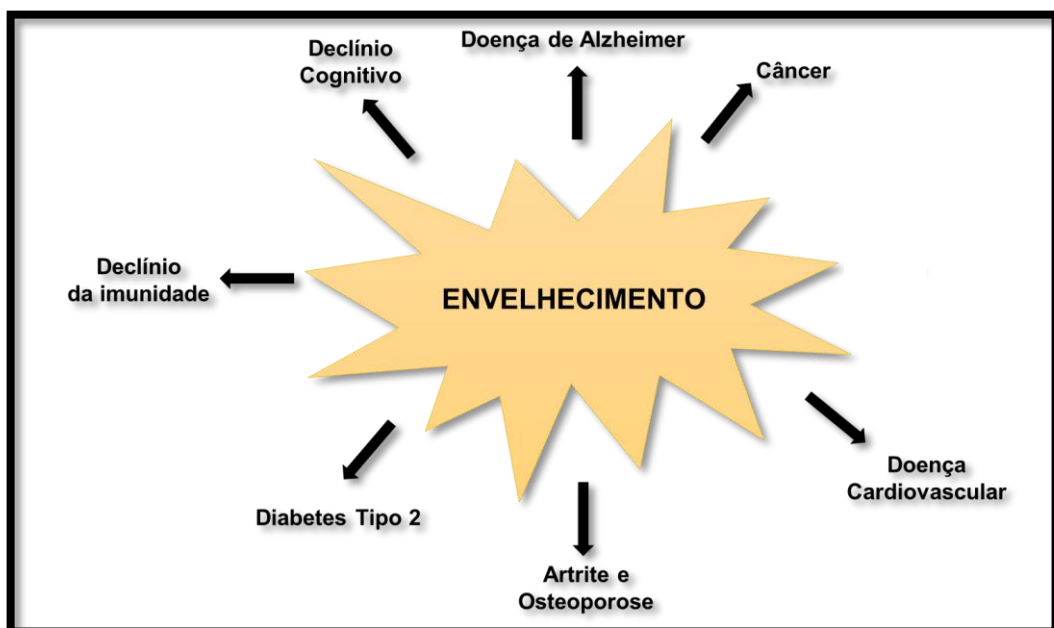


Figura 1: O envelhecimento e o surgimento de doenças (Adaptado de KAEBERLEIN, 2016).

O envelhecimento saudável, caracterizado pela ausência de doenças crônicas graves com manutenção de atividades motoras, de memória e de saúde mental, é uma condição desejável e de grande interesse de grupos de pesquisa (MA et al., 2017). Acredita-se que a busca pelo envelhecimento saudável, vivenciado pelo surgimento da senescência desassociada de doenças degenerativas, contribua com o aumento do tempo de vida de alguns indivíduos, que ultrapassa a expectativa média de vida em um grupo populacional (KACHAR, 2010).

O avanço científico nas tecnologias de intervenções médicas e de saúde pública que combatem doenças fatais e incapacitantes, tem auxiliado na sobrevivência de indivíduos durante o processo de envelhecimento (OLSHANSKY, 2014). A longevidade, caracterizada por aumento do tempo de vida que ultrapasse a expectativa de vida média da população, em geral, está atrelada a melhoria da tecnologias da saúde (PATRICIO et al., 2008).

Vários trabalhos apoiam a hipótese de que cuidados com saúde, higiene, alimentação entre outros fatores ambientais, influenciam, de forma marcante, o tempo de vida de um indivíduo. Contudo, poucos são os trabalhos realizados em seres humanos que avaliam fatores genéticos de predisposição relacionados com o aumento do tempo de vida acima da média da população no Brasil.

Neste sentido, a busca por parâmetros genéticos e ambientais que influenciam no aumento do tempo de vida de indivíduos (que ultrapasse a expectativa média de vida da população) mostra-se um desafio para a biologia e medicina. Estudos em indivíduos longevos são extremamente relevantes para fornecer conhecimentos sobre parâmetros genéticos, biológicos e proteicos, que podem possibilitar, futuramente, a adoção de estratégias de saúde relacionadas com o controle e manutenção da vida (BROOKS-WILSON, 2013).

### **1.1.1 Envelhecimento no Brasil**

Em geral, países desenvolvidos possuem população com maior expectativa de vida do que países em desenvolvimento, como o Brasil. Contudo, estudos recentes mostram que o número de idosos no Brasil tem aumentado, bem como, sua idade média de expectativa de vida (VERAS; OLIVEIRA, 2018).



Atualmente, a expectativa média de vida da população brasileira está estimada em 76,25 anos. Esta estimativa varia de acordo com o gênero, sendo 72,74 anos para homens e 79,80 anos para mulheres. No Espírito Santo, estes valores estão aumentados, com idade média de expectativa de vida de 78,79 anos, na população geral, e de 74,97 anos para homens e 82,76 anos para mulheres (IBGE, 2018a).

De acordo com o Governo do Brasil (2016), a proporção de idosos de 60 anos ou mais chegou a 14,3% no país e a tendência é que no ano de 2020 o número de idosos alcance 32 milhões de indivíduos (VERAS; OLIVEIRA, 2018). Assim, devido às altas taxas de natalidade no passado, em junção com a redução da mortalidade nas idades mais idosas, espera-se que a população acima de 80 anos apresente elevadas taxas de crescimento para os próximos anos (CAMARANO; KANSO, 2010).

A projeção em pirâmide para a população brasileira, mostra que a população idosa (acima de 60 anos), de homens e mulheres, aumentará de maneira considerável nos próximos anos, chegando a uma expectativa de número de idosos acima dos números de nascimentos para 2050 (figura 2) (THE POPULATION DIVISION OF THE DEPARTMENT OF ECONOMIC AND SOCIAL AFFAIRS, 2017).

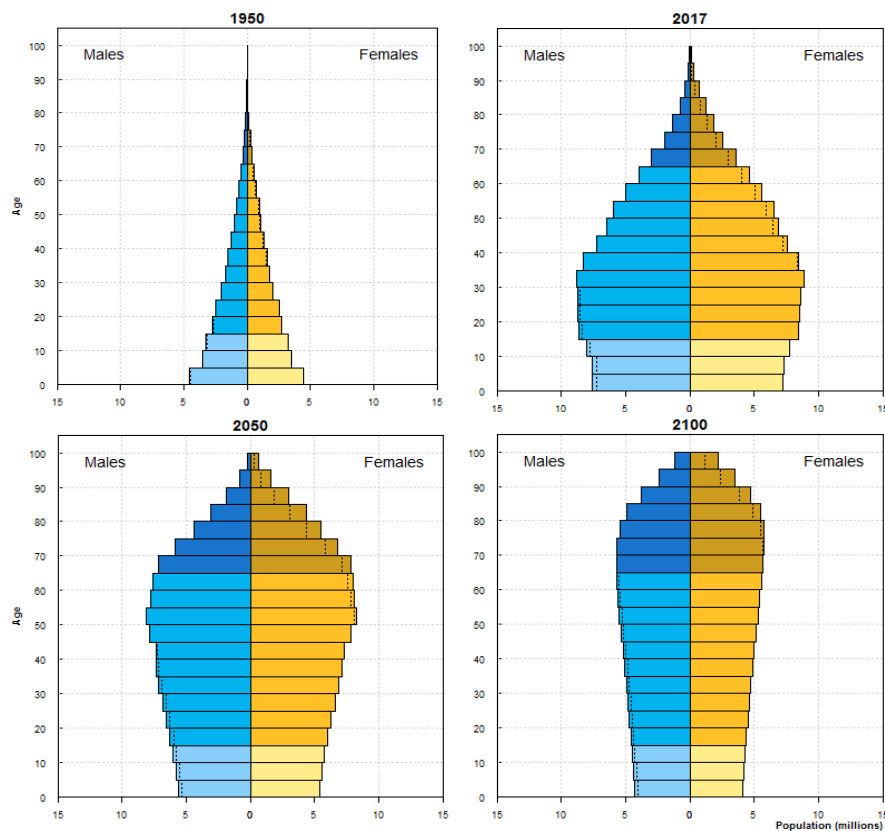


Figura 2: Projeção para a população brasileira em milhões para os anos de 2050 e 2100 comparados com os anos de 1950 e 2017. Fonte: United Nations, 2017.

Projeções como estas reforçam a importância de estudos que melhorem nossa compreensão sobre as relações entre biologia, medicina, envelhecimento e fatores de predisposição à longevidade. Conhecimento sobre o perfil de variantes genéticas relacionadas com longevidade pode fornecer informações acerca da melhoria da qualidade de vida e de parâmetros biológicos que auxiliem futuramente na adoção de estratégias de manutenção da vida daqueles chamados de muitos idosos (CAMPOS et al., 2016).

## 1.2 A LONGEVIDADE HUMANA E FATORES

Em países desenvolvidos e em alguns países em desenvolvimento, tem se oportunizado viver mais que as gerações passadas. Este fato está atrelado ao progresso da medicina, bem como nas modificações no estilo de vida. Porém, devido ao avanço da idade, problemas relacionados ao envelhecimento biológico surgem e são desafios a serem enfrentados por essa parcela da população (OLSHANSKY, 2014).

A longevidade humana é determinada por diversos fatores e os mecanismos genéticos ainda não estão bem esclarecidos. Entretanto, sabe-se que a duração do tempo de vida e do envelhecimento humano é determinada, em parte, pelo fator genético (HERSKIND et al., 1996; RUBY et al., 2018).

Características humanas, como a longevidade, são influenciadas, em geral, por diferentes condições ambientais e diversas variantes genéticas, presentes em múltiplos genes. Examinar um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) fará com que se perca tal complexidade (DATO et al., 2018). Deste modo, além de estudar qual o impacto do estilo de vida para o aumento da expectativa da mesma, a busca por múltiplos polimorfismos genéticos mostra-se essencial para a compreensão do papel destes para a extensão do tempo de vida.

Os resultados de estudos têm demonstrado a influência de diferentes genes, que apresentam homologia com genes de seres humanos, na extensão do tempo de vida. Organismos modelos, como *Caenorhabditis elegans* (verme nematódeo) e a *Drosophila* sp. (mosca-da-fruta), frequentemente, são analisados para estudar o

envelhecimento e seus aspectos genéticos e biológicos (BROWNER et al., 2004).

De acordo com Moskalev et al (2014), genes que controlam o envelhecimento e a longevidade são chamados de gerontogenes. Estes autores sugeriram que as formas mais eficazes para os identificar envolvem utilização de organismos modelos, pois, neles é possível realizar testes funcionais de superexpressão ou inativação de genes e observar os resultados no tempo de vida dos organismos.

A maioria dos gerontogenes possuem papéis bem definidos nas funções de reparo e manutenção dos organismos, sendo que alterações nessas regulações podem acarretar em mudanças nos produtos gênicos (RATTAN, 2006). Acredita-se que filhos herdaram de seus pais longevos, genes ou conjuntos de genes que podem estar associados à proteção contra enfermidades, tais como diabetes e doença cardíaca isquêmica (CAPRI et al., 2006).

O estudo *“The influence of gender on inheritance of exceptional longevity”* realizado por Deluty et al. (2015) evidenciou que mães de homens e mulheres centenários de Judeus Asquenazes viviam mais tempo em comparação com as mães de não centenários. Estes autores relataram que homens centenários herdaram a herança associada à longevidade seja da linhagem materna ou paterna. Em contrapartida, para as mulheres centenárias acredita-se que somente a linhagem materna influencia positivamente a herança relacionada à longevidade. O que mostra que o gênero pode influenciar na extensão do tempo de vida.

As mutações que ocorrem em alguns genes afetam a resposta ao estresse e de detectar e reagir aos nutrientes obtidos através da alimentação. Assim, quando há abundância de comida e o estresse é baixo, ocorre o crescimento e a reprodução suportada pelos genes. Entretanto, caso ocorra condição contrária, ocorrem mudanças que visam a proteção e neste sentido, o ajuste do gene regulador devido ao estresse elevado pode auxiliar na extensão do tempo de vida, aonde o corpo responderá a essas mudanças (KENYON, 2010).

A fim de destacar a importância da biologia para a longevidade, Rafi e Alavi (2017) em seu estudo *“Debate on human aging and lifespan”*, discutem a questão do tempo máximo da longevidade humana dividida em três visões: “otimista”, “futurística” e “realista”. Nas duas primeiras, há convergência em acreditar que a biotecnologia pode

auxiliar no aumento do tempo de vida, enquanto que os “realistas” creem que a biologia determine de maneira crucial a longevidade.

Assim, melhorar nossos conhecimentos sobre os aspectos genéticos que influenciam no tempo de vida, em especial, que favorecem a longevidade humana, podem contribuir na adoção de estratégias futuras de manutenção da saúde em idosos.

### 1.3 POLIMORFISMOS GENÉTICOS POTENCIAIS ASSOCIADOS À LONGEVIDADE HUMANA: FUNÇÕES E IMPLICAÇÕES

Entre os diversos fatores que influenciam na longevidade humana, destacam-se as contribuições genéticas. Estudos com gêmeos demonstraram que a longevidade está associada a genética em torno de 25%, onde fatores como o estilo de vida e epigenética são importantes contribuintes para o processo de envelhecimento (TAORMINA; MIRISOLA, 2015). Uma das formas de investigação de como variantes genéticas podem estar relacionadas com a herança da longevidade é realizar estudo de associação com polimorfismos genéticos.

As mutações – deleção, inserção ou substituição - são variações genéticas raras na sequência de DNA de indivíduos de uma população. Polimorfismos e mutações compõem um conjunto de variações genéticas caracterizadas por variações de nucleotídeo único (SNV). O polimorfismo genético é definido como uma variação genética que possui frequência populacional superior a 1% encontrada na sequência de DNA de uma população (BALASUBRAMANIAN et al., 2004). Os polimorfismos podem ser transmitidos junto com outros genes que possuem proximidade cromossômica e por isso podem atuar também como marcadores genéticos (ROCHA et al, 2007).

Já os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), podem apresentar interesse médico e estarem relacionados com características específicas. Os SNPs podem estar localizados nos éxons afetando então, a estrutura ou até mesmo função da proteína, ou em regiões não codificantes, afetando a expressão ou estabilidade de um transcrito (BROWNER et al., 2004).

Neste sentido, vários estudos avaliam a presença de variações genéticas polimórficas e suas participações na predisposição ao aumento da expectativa de vida de indivíduos da população. Estudos de associação sugerem que SNVs como os rs12206094 e rs4946935 do gene *FOXO3* possam estar relacionados com a manutenção da longevidade humana em populações específicas (FLACHSBART et al., 2017). O gene *FOXO3* está relacionado com a via de sinalização da insulina, possível fator que regula o metabolismo de açúcares, controlando níveis glicêmicos no organismo (KENYON, 2010).

Outros SNVs, provavelmente, atuam, favorecendo o surgimento de doenças específicas de manifestação preferencial no idoso, como no caso do alelo  $\epsilon 4$  do gene *APOE*, que predispõe à doença de Alzheimer (SCHÄCHTER et al., 1994). A proteína codificada pelo gene *APOE* é uma glicoproteína com diversas funções que regula o nível lipídico no plasma. Possivelmente, o alelo de risco deste gene atue contribuindo, de forma prejudicial, com a formação dos aglomerados de proteína precursora amiloide no cérebro dos pacientes (ALVIM et al., 2010).

Estas variações genéticas apresentam potencial para serem investigadas como biomarcadores de longevidade humana porque podem indicar vias metabólicas que apresentem impacto marcante no aumento da expectativa de vida. No futuro, estes genes, suas proteínas codificadas e as suas vias metabólicas relacionadas podem ser alvo de intervenções, por meio, por exemplo, de mudanças na alimentação, adição de suplementos ou mudanças em hábitos de vida, auxiliando no controle e manutenção da vida saudável em idosos.

### **1.3.1 Gene *MTHFD1L***

O gene metilenoetotetrahidrofolato desidrogenase (NADP<sup>+</sup> dependent) 1 like, ou *MTHFD1L*, está localizado no cromossomo 6q25.1 (figura 3) e possui 236 kb com 28 éxons (PRASANNAN et al., 2003).

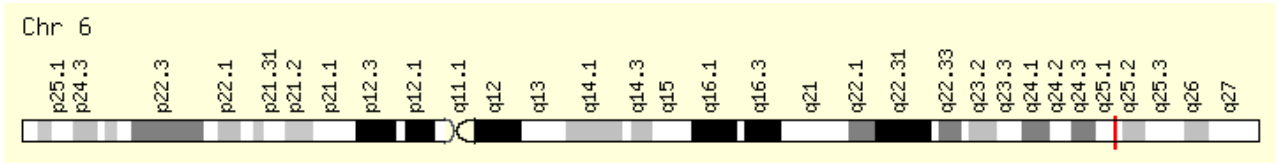


Figura 3: Localização do gene *MTHFD1L* no cromossomo 6. Fonte: Gene Cards.

O SNV rs11754661 do gene *MTHFD1L* está localizado na região intrônica, sendo responsável pela variação genética de G>A.

Este gene codifica uma proteína que participa de movimentos cíclicos entre mitocôndria e citoplasma gerando metabólitos essenciais para o crescimento da célula (figura 4). Além disso, sua proteína atua no transporte de serina, glicina e formato através da membrana mitocôndria (LEE et al., 2017; YANG et al., 2018).

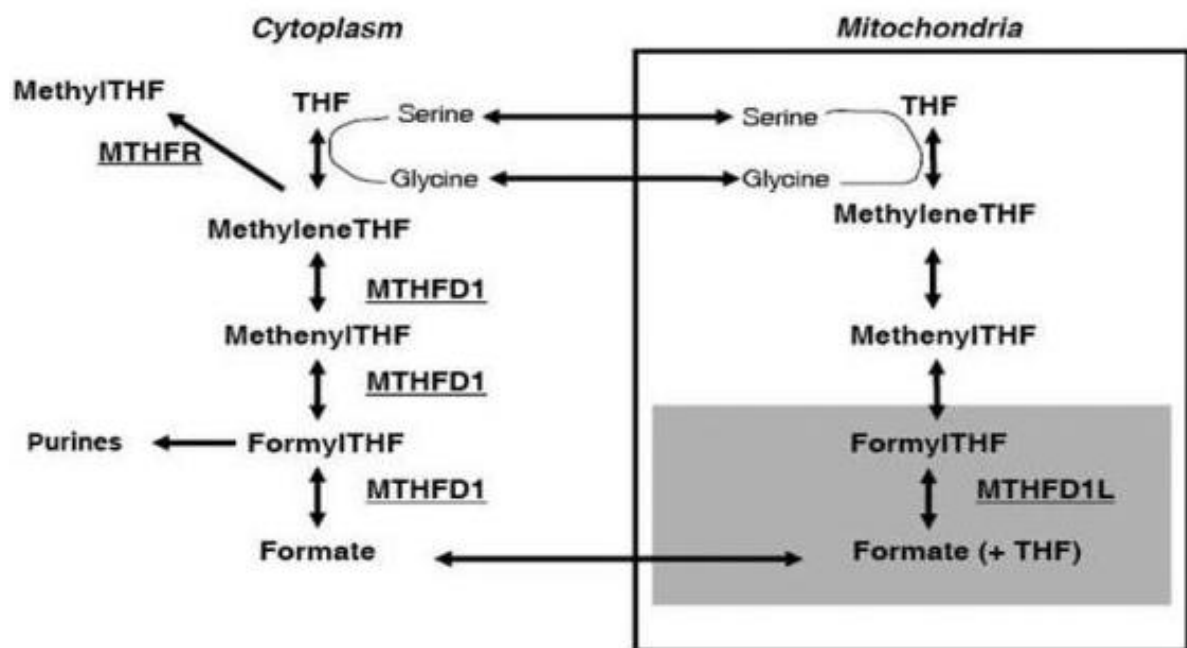


Figura 4: Esquema simplificado do metabolismo do folato nas mitocôndrias e no citoplasma (PARLE-MCDERMOTT et al., 2009).

O gene *MTHFD1L* é responsável por codificar a enzima C1-Tetrahydrofolato Sintase, que está localizada na mitocôndria e parece ser monofuncional (PARLE-MCDERMOTT et al., 2009). Além disso, é importante na formação do formato na mitocôndria, que é indispensável para a biossíntese de purinas (PIKE et al., 2010; YANG et al., 2018).

Momb et al. (2013) apresentou em seu estudo o bloqueio da passagem de formato na mitocôndria para o citoplasma devido à interrupção da ação do gene *MTHFD1L* em camundongos, o que demonstra a participação deste no metabolismo mediado pelo folato.

De acordo com Palmer et al. (2014), alguns polimorfismos de *MTHFD1L* podem aumentar o risco de doença coronariana e nos metabólitos nas vias do folato. Sendo assim, alterações nesta via, podem influenciar em processos biológicos, como na síntese de DNA e na geração de potencial de metilação celular já que as vitaminas do complexo B e folato são essenciais nestes casos (WERNIMONT et al., 2011). Esta via também é importante para o câncer, pois a mesma atende a demandas nutricionais específicas dessa doença (LEE et al., 2017).

Esta variação genética também pode contribuir para o estilo de resposta ruminativa, bem como mostrou relação com a depressão e com outros transtornos mentais e físicos (A.C. et al., 2010; ESZLARI et al., 2017). Em relação ao câncer, estudos sugerem que variações deste gene estão relacionadas com carcinoma de células escamosas do esôfago (YANG et al., 2018). O polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) rs11754661 do gene *MTHFD1L* mostrou associação desta variante com o aparecimento de doença de Alzheimer tardia.

Como este gene está associado com a mitocôndria, importante organela que atua no fornecimento de energia celular, e serem as principais geradoras de radicais livre nos seres humanos, a variação genética rs11754661 do gene *MTHFD1L* é um potencial alvo de investigação quanto a sua influência na longevidade humana devido a diminuição do funcionamento mitocondrial devido a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) (SILVA; FERRARI, 2012).

### **1.3.2 Gene *SERPINA3***

O gene *SERPINA3* está localizado no cromossomo 14q32.1 e é um membro da superfamília *SERPINA*, que codificam proteínas inibidoras de protease (CHANDRA et al., 1983), anteriormente conhecido também como  $\alpha$ 1-Antichimotripsina ( $\alpha$ 1-ACT) em seres humanos (LUO et al., 2017).

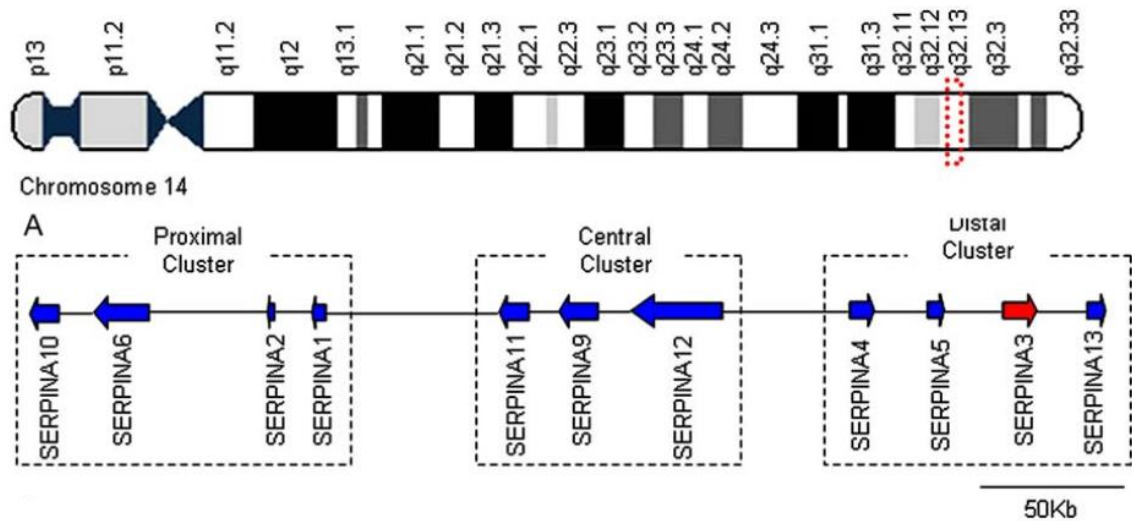


Figura 5: Localização do gene *SERPINA3* no cromossomo 14 (Seta vermelha). Fonte: (BAKER et al., 2007).

As serpinas atuam em diversos processos biológicos como coagulação, inflamação e na cicatrização de feridas. Além disso, inibem a atuação de proteases, bem como funcionam como chaperonas ou transportadoras de hormônios na circulação. A proteína Serpina3 é secretada na fase de inflamação aguda ou crônica (CHELBI et al., 2012).

Estudos demonstram que o gene está envolvido na doença de Parkinson e Alzheimer e que o polimorfismo de *SERPINA3* A/T é um fator de risco para hemorragia subaracnóide aneurismática (SLOWIK et al., 2005; ZHANG et al., 2017).

Em pacientes chineses, foi estudada a associação entre o polimorfismo rs4394 e aneurismas intracranianos esporádicos. Porém, não foi encontrada nenhuma relação (LIU et al., 2009).

Neste sentido, devido à participação do gene *SERPINA3* em processos inflamatórios, bem como em doenças degenerativas que podem estar associadas com a idade avançada, este estudo avaliou a associação entre o polimorfismo rs4943 com a longevidade humana.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar a associação entre os polimorfismos rs4934 do gene *SERPINA3* e rs11754661 do gene *MTHFD1L* e a longevidade humana.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a amostra de pacientes considerados longevos e controles;
- Avaliar as frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos dos genes *SERPINA3* (rs4934) e *MTHFD1L* (rs11754661) em indivíduos controles e longevos;
- Verificar a associação entre os SNPs rs4934 de *SERPINA3* e rs11754661 de *MTHFD1L* e a longevidade humana.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 AMOSTRA

Este trabalho foi realizado em colaboração com a professora do curso de nutrição da UFES, Doutora Geralda Gillian Silva-Sena, os graduandos Matheus Corteletti e Nathália Erlacher Espíndula.

Os participantes desta pesquisa, que compõem o grupo amostral, foram selecionados por meio de convite oral enquanto aguardavam atendimento geriátrico no Hospital Santa Casa de Misericórdia de Vitória (HSCMV) do setor de geriatria coordenado pelo Dr. Renato Lírio Morelato. A coleta das amostras foi realizada entre os anos de 2014 e 2015, como descrito em SILVA-SENA et al. (2018). A etnia dos participantes foi estimada segundo características físicas avaliadas pelos pesquisadores, como descrito por SILVA-SENA et al. (2018).

Todos os participantes da pesquisa, ou seus representantes legais, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo A). Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, com número de registro: CAAE 14815413.1.0000.5060 (Anexo B). Este trabalho foi conduzido de acordo com a Resolução CNS Nº 446/12 e com o Código de Ética Médica de 2009.

Este foi um estudo transversal, analítico e observacional que investigou a associação entre polimorfismos genéticos e longevidade humana. Para compor o grupo caracterizado como longevos foram selecionados 220 indivíduos que possuíam 85 anos ou mais no momento da coleta (média de idade  $89\pm 4$ ). Já para o grupo controle participaram 232 pacientes entre 70 a 75 anos de idade (média de idade  $72\pm 2$ ).

#### 3.2 COLETA DE SANGUE E EXTRAÇÃO DE DNA

Foram coletados oito mililitros de sangue periférico de pacientes idosos e condicionados em tubos contendo EDTA (Ácido etilenodiaminotetracético), um agente anticoagulante, e refrigerados a 4°C para posterior análise.

Antes de realizar a extração de DNA as amostras foram submetidas ao NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Delaware, EUA) para verificar a concentração e pureza do DNA. Após, para a extração de DNA, foi utilizada a metodologia de Miller et al (1988). As amostras foram quantificadas por espectrofotômetro.

### 3.3 PCR E SEQUENCIAMENTO DOS GENES *MTHFD1L* E *SERPINA3*

Após a extração do DNA do sangue periférico dos pacientes procedeu-se a técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), com *primers* específicos para cada gene, a fim de se verificar o tamanho da banda de interesse do gene amplificado, conforme tabela 1.

**Tabela 1.** Relação dos *primers* utilizados para o estudo dos genes *SERPINA3* e *MTHFD1L*.

Gene	<i>Primer Forward</i>	<i>Primer Reverse</i>	Tamanho da banda (pb)
<i>SERPINA3</i> (rs4934)	CAGAGTTGAGAATGGAGA	TTCTCCTGGGTCAGATTC	124
<i>MTHFD1L</i> (rs11754661)	CGTTGACTTTTTTATTTTTCTCA TCTTTTGGGAGATACA	CGCCTGAGCCTCCAGCAT AGCT	441

A reação de em cadeia da polimerase (*PCR*) para os genes *MTHFD1L* e *SERPINA3* foi realizada de acordo com os dados da tabela 2 a seguir:

**Tabela 2.** Condições para a PCR convencional para sequenciamento.

Gene	Desnaturação Inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão Final	Ciclos
<i>SERPINA3</i>	94°C 10 min	94°C 35 s	62°C 35 s	72°C 30 s	72°C 10 min	30
<i>MTHFD1L</i>	94°C	94°C	60°C	72°C	72°C	35

10 min

35 s

35 s

30 s

10 min

Os resultados obtidos na PCR foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 7%, por 1 hora e 40 minutos a 240V.

Foi realizado o sequenciamento de *Sanger* em 3% das amostras para validação dos resultados. Os resultados de sequenciamento forneceram os genótipos padrões utilizados como controles nas corridas de PCR em tempo real.

### 3.3.1 Sequenciamento de Sanger

Seguindo o protocolo do fabricante, procedeu-se o sequenciamento de Sanger, após realizar a PCR e verificar as amostras em gel de poliacrilamida.

Para a reação de sequenciamento foi utilizado o kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit utilizando-se a plataforma de sequenciamento ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA).

Para purificar os produtos da amplificação um mix com 5µl de produto de PCR, 1µl da enzima ExoProStar e 1µl de fosfatase alcalina, foi levado ao termociclador à temperatura de 37°C por 15 minutos e após a 80°C durante 15 minutos.

Para a reação de sequenciamento foi feito um mix com 4µl do produto purificado, 0,32µl do primer, 1,68µl de água ultrapura, 3,5 µl de buffer do Big Dye e 0,5µl de Big Dye. A reação foi levada ao termociclador e submetido às seguintes condições: 96°C por 1 minuto; 96°C por 10 segundos; 50°C por 5 segundos; 60°C por 4 minutos. As três últimas etapas são repetidas 25 vezes.

Após, para a precipitação utilizou-se o seguinte protocolo:

- 2 µl de Acetato de sódio 3M pH 5,2 e 2 µl de EDTA 125mM pH 8,0 serão adicionados aos 10µl da reação de sequenciamento e vortexado rapidamente;
- A reação será adicionada 50 µl de etanol 100% e vortexado rapidamente;
- Incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos;
- Centrifugar por 20 minutos a 14 000 rpm;

- Com a pipeta, aspirar o sobrenadante e descartá-lo;
- Ao pellet adicionar 250 µl de etanol 70% e vortexar rapidamente;
- Centrifugar por 10 minutos a 14 000 rpm;
- Novamente, aspirar o sobrenadante com uma pipeta e descartá-lo;
- Repetir os dois últimos passos;
- Em um termociclador, secar as amostras por 3min a 80°C;
- Armazenar em geladeira e proteger da luz até a seguinte etapa.

Para finalizar o sequenciamento, as amostras foram levadas ao serviço de sequenciamento do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

### 3.4 GENOTIPAGEM DO GENES *SERPINA3* e *MTHFD1L*

Para a genotipagem foi realizada a PCR em Tempo Real utilizando sondas específicas dos SNPs rs4934 do gene *SERPINA3* (TaqMan - C\_2188895\_10) e rs11754661 do gene *MTHFD1L* (TaqMan - C\_\_\_\_95249\_10) da Thermo Fisher Scientific e o Master Mix da TaqMan®.

Os reagentes para a PCR em Tempo Real estavam nas seguintes proporções na reação: 10 µL de água ultrapura, 8,5 µL de TaqMan® Master Mix, 0,5 µL TaqMan® Custom SNP Genotyping Assays 40x e 1 µL da amostra de DNA. O volume final da solução foi de 20 µL.

O equipamento utilizado para a PCR em tempo real foi o Rotor Gene Q Series v.2.1 (Qiagen) e a termociclagem ocorreu nas seguintes condições: durante 10 minutos a 95°C para a desnaturação e abertura da fita dupla, em seguida 50 ciclos de 95°C por 15 segundos (Desnaturação) e 61°C por 60 segundos (Extensão e Anelamento). Para amostra negativa foi utilizada a mesma proporção de reagentes, entretanto ao invés do DNA foi utilizada a água ultrapura. Em todas as corridas, foram utilizados os padrões dos genótipos identificados no sequenciamento de *Sanger* GG, AG e AA para *MTHFD1L* e GG, AG e AA para *SERPINA3*.

### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram comparadas a frequência alélica e genotípica entre casos e controles e a associação dos polimorfismos com a longevidade através dos testes qui-quadrado ( $\chi^2$ ) ou teste exato de Fisher, *Odds Ratio* (OR) com intervalo de confiança (IC) de 95%. Para estas análises foi utilizado O programa SPSS® versão 25.0 para Windows.

Para cálculo do Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (EHW) foi utilizado a ferramenta online OEGE (*Online Encyclopedia for Genetic Epidemiology studies*) com grau 1 de liberdade (RODRIGUEZ; GAUNT; DAY, 2009). Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados significativos.

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foi avaliada a associação entre a longevidade humana e os polimorfismos rs11754661 do gene *MTHFD1L* e rs4934 de *SERPINA3* em idosos do estado do Espírito Santo, Brasil. Estudos anteriores demonstram que a longevidade humana é multifatorial, sendo influenciada pelo ambiente e fatores genéticos (SILVA-SENA et al., 2018). Neste sentido, o presente trabalho teve como finalidade elucidar a participação de variantes genéticas na extensão do tempo de vida.

Informações sobre proporção sexual e etnia de indivíduos dos grupos amostrais desta pesquisa estão citados na tabela 3.

**Tabela 3.** Dados referentes ao gênero e etnia dos participantes da amostra.

Grupos amostrais (Média de Idade)		<b>Longevos</b> (89 ± 4 anos) <b>N (%)</b>	<b>Controles</b> (72 ± 2 anos) <b>N (%)</b>	
<b>Variável</b>				Valor de <i>p</i>
<b>Gênero</b>	Masculino	64 (29,09)	75 (32,32)	0,456
	Feminino	156 (70,90)	157 (67,67)	
	Total	N=220	N=232	
<b>Etnia</b>	Caucasoide	131 (59,54)	148 (63,79)	0,532
	Afro-Brasileiro	88 (40,00)	82 (35,34)	
	Não informado	1 (00,45)	2 (0,86)	

N=número de indivíduos; dp = desvio padrão; valor de *p*= associação entre a variável com longevos e controles pelo teste  $\chi^2$

Existe grande controvérsia na escolha do grupo controle ideal para estudo da longevidade. O grupo controle mais próximo ao ideal para esta linha de pesquisa seria por meio de um estudo longitudinal com a seleção de indivíduos que já tivessem falecido com idade próxima a expectativa média de vida da população. Como o presente estudo apresenta um desenho transversal, a organização do grupo controle

foi baseada na seleção de indivíduos que apresentavam idade próxima a expectativa média de vida da população estudada, ou seja, com projeção para o falecimento. Baseado na Tábua de Mortalidade do IBGE fornece uma projeção da expectativa de vida ao nascer para 76 anos no total, enquanto que para a população masculina, a expectativa de vida ao nascer é de 72,5 anos. Já a das mulheres é de 79,6 anos. Contudo, é possível que um pequeno número de indivíduos da amostra controle sobreviva até 85 anos ou mais (IBGE, 2018).

#### 4.1 Variável rs11754661 do gene *MTHFD1L*

Foram genotipadas amostras de 363 indivíduos para o polimorfismo rs11754661 do gene *MTHFD1L*, sendo 179 de longevos e 184 de controles. Os resultados de frequência de genótipos, frequência de alelos e análise estatística deste gene estão mostrados na tabela 4.

**Tabela 4.** Frequência de genótipos e alelos do polimorfismo rs11754661 do gene *MTHFD1L*.

	<b>Longevos</b> <b>N (%)</b>	<b>Controles</b> <b>N (%)</b>	OR (95% IC)	Valor de <i>p</i>
	N= 179	N= 184		
<b>Genótipo</b>				
<b>GG</b>	162 (90,5)	152 (82,6)	2,006 (1,070 - 3,761)	0,030
<b>AG</b>	17 (9,5)	31 (16,9)	0,518 (0,275-0,974)	0,041
<b>AA</b>	0 (0)	1 (5)	-	-
<b>Alelo</b>				
<b>G</b>	341 (95,3)	335 (91,0)	1,976 (1,080-3,616)	0,027
<b>A</b>	17 (4,7)	33 (9,0)		

N= número de indivíduos; OR= Odds Ratio; IC= Intervalo de confiança; Valor de *p*= associação entre longevos e controles.



A distribuição de genótipos do gene *MTHFD1L* está em Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* para a amostra de longevos ( $p=0,505$ ) e controles ( $p=0,665$ ).

Houve diferença significativa entre a distribuição de frequência dos genótipos GG e AG entre os grupos de longo e controle, sugerindo que esta variante genética influencia no processo de longevidade humana. Não foi possível realizar a associação entre o genótipo AA devido ao baixo número amostral.

Na frequência alélica do *SNP* rs11754661 do gene *MTHFD1L* também houve diferença significativa entre os grupos de longo e controle, apoiando a hipótese de que esta variante genética pode estar relacionada com o processo de longevidade.

O genótipo GG do gene *MTHFD1L* se comportou como fator de risco para a longevidade, enquanto que o genótipo AG, atuou como fator de proteção para a esta característica. Vale salientar que quando se utiliza a palavra de risco para a longevidade, isto significa, neste caso, que aquele que porta esse genótipo pode ter tendência a viver mais, quando comparado ao grupo controle. Da mesma forma, os resultados sugerem que o alelo G atua como fator de risco, enquanto o alelo A como fator de proteção.

O gene *MTHFD1L* codifica uma proteína que atua em rotas metabólicas de importância para a manutenção da saúde e homeostase corporal. As funções desta proteína sugerem que ela também pode ter papel relevante no prolongamento da vida, pois participa de vários eventos metabólicos de grande importância para a mitocôndria, como na síntese do formato mitocondrial, metabolismo de aminoácidos, biossíntese de metionina e de proteínas da mitocôndria (PRASANNAN et al., 2003; PRASANNAN; APPLING, 2009).

Em Saade et al. (2011), no seu trabalho "*Large scale association analysis identifies three susceptibility loci for coronary artery disease*", o autor identificou que na população libanesa rs6922269 do *MTHFD1L* tinha efeito protetor contra doença coronariana e infarto do miocárdio. Além disso, estudos realizados demonstraram que o alelo A deste polimorfismo está ligado ao infarto do miocárdio (KATHIRESAN et al., 2009). Assim, uma das nossas hipóteses está relacionada ao efeito protetor relacionado ao genótipo GG para as doenças relacionadas ao coração.

Palmer et al. (2014) sugeriram que polimorfismos de *MTHFD1L* podem influenciar no risco de doença coronariana e de metabólitos nas vias do folato, afirmando que

defeitos nas vias metabólicas do C1-tetrahydrofolato podem contribuir para a diminuição da vitamina B12, que pode ser obtida através do consumo de alimentos de origem animal, como carnes, leites e ovos (GREEN et al., 2017).

Com o avanço da idade, é comum a prevalência da anemia devido o declínio da hemoglobina causada pela alimentação precária ou devido as respostas adversas do organismo do idoso devido à idade avançada. Assim, a anemia pode estar associada a deficiência de ferro ou em combinação com a deficiência de folato e da vitamina B12 (GURALNIK et al., 2004).

De tal modo, sabendo que o folato está associado a produção dos glóbulos vermelhos, sugere-se que o polimorfismo rs11754661, genótipo GG, de *MTHFD1L* esteja envolvido positivamente na extensão do tempo de vida em humanos devido a sua participação no metabolismo do folato. Todavia, há necessidade de estudos mais aprofundados para verificar a participação deste gene em associação a doenças relacionadas as hemácias, bem como verificando-se o consumo de alimentos que fornecem a vitamina B12 e o folato.

#### 4.2 Variável rs4934 do gene *SERPINA3*

Foram genotipadas amostras de 436 indivíduos para o polimorfismo rs4934 do gene *SERPINA3*, sendo 213 longevos e 223 controles. Os resultados de frequência de genótipos, de frequência de alélica e de análise estatística deste gene estão demonstrados na tabela 5.

**Tabela 5.** Frequência de genótipos e alelos do polimorfismo rs4934 do gene *SERPINA3*.

	<b>Longevos</b> <b>N (%)</b>	<b>Controles</b> <b>N (%)</b>	OR (95% CI)	Valor de p
	N= 213	N=223		
<b>Genótipo</b>				
<b>GG</b>	84 (39,5)	82 (36,8)	1,120 (0,761 - 1,648)	0,567
<b>AG</b>	93 (43,6)	111 (49,8)	0,782 (0,536 - 1,140)	0,201

<b>AA</b>	36 (16,9)	30 (13,4)	1.308(0.773 - 2.213)	0,316
<b>Alelo</b>				
<b>G</b>	261 (61,3)	275 (61,7)	0,984 (0,749-1,292)	0,905
<b>A</b>	165 (38,7)	171 (38,3)		

N= número de indivíduos; OR= *Odds ratio*; IC= Intervalo de confiança; valor de p=associação entre a longevidade humana e os grupos.

A distribuição de genótipos do gene *SERPINA3* na amostra está em Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* para longevos ( $p=0,243$ ) e controles ( $p=0,431$ ).

Para o gene *SERPINA3* rs4934 não houve diferença significativa no estudo de associação nem entre os genótipos, nem entre os alelos.

O gene *SERPINA3*, anteriormente conhecido como alfa-antiquimotripsina, é um membro da superfamília da Serpina de inibidores de proteases (LUO et al., 2017). A proteína Serpina3 é secretada na fase de inflamação aguda ou crônica (CHELBI et al., 2012). Estudo realizado para verificar a expressão do *SERPINA3* demonstrou que no melanoma em estágio avançado há regulação positiva do gene devido a remodelação da matriz do tecido fora da célula (ZHOU et al., 2017). Assim, existe a possibilidade de variantes deste gene atuarem prejudicando o aumento do tempo de vida, uma vez que ele está associado a uma doença grave.

Em nosso estudo, o polimorfismo genético rs4934 referente a este gene não demonstrou associação entre a longevidade humana e os grupos estudados. Este resultado pode ser devido ao pequeno tamanho da nossa amostra de estudo que não pode ter sido suficiente para que a análise estatística tivesse poder de determinar sua influência. Ou ainda este resultado pode ter sido negativo devido ao fato desta variante genética realmente não possuir influência na variação de extensão de tempo de vida.

Todavia, tal polimorfismo mostrou associação com risco de ruptura de aneurisma na população do Cazaquistão, onde a frequência alélica (G=536) mostrou-se semelhante em números à porcentagem observada na população do presente trabalho (ZHOLDYBAYEVA et al., 2018). Contudo, como a longevidade é uma característica multifatorial outras variantes que diferem entre estes dois grupos populacionais podem

estar contribuindo com diferentes características entre estes dois povos, apesar das frequências das variantes genéticas serem semelhantes.

Estudos propõem que a variável rs4934 do gene *SERPINA3* possui potencial como um biomarcador prognosticador de gliomas, com potencial para alvo terapêutico (LUO et al., 2017). Contudo, no nosso trabalho o polimorfismo rs4934 do gene *SERPINA3* não mostrou associação com a longevidade humana.

## 5 CONCLUSÕES

A longevidade é uma característica poligênica e multifatorial. Este trabalho investigou parâmetros genéticos que podem influenciar na longevidade humana. Com base nos resultados desta pesquisa conclui-se que: i) o polimorfismo rs4934 do gene *SERPINA3* não está associado com longevidade humana; ii) o polimorfismo rs11754661 do gene *MTHFD1L* está associado com a longevidade humana na amostra da Grande Vitória-ES.

Em relação ao polimorfismo rs11754661, os resultados desta pesquisa nos permitem concluir que indivíduos da Grande Vitória-ES portadores do genótipo GG do gene *MTHFD1L* possuem maiores chances de atingirem a longevidade, enquanto que aqueles portadores do genótipo AG apresentam uma redução nas chances de atingirem a longevidade. Estes resultados apoiam a hipótese de que esta variante genética pode ser um potencial biomarcador de longevidade humana.

Estes resultados podem auxiliar na caracterização dos fatores genéticos relacionados com a longevidade humana, informação que, no futuro, será útil no planejamento de estratégias que visem o aumento da expectativa de vida da população.

## REFERÊNCIAS

- A.C., N. et al. Dementia revealed: Novel chromosome 6 locus for Late-onset alzheimer disease provides genetic evidence for Folate-pathway abnormalities. **PLoS Genetics**, 2010.
- ALVIM, R. O. et al. APOE polymorphism is associated with lipid profile, but not with arterial stiffness in the general population. **Lipids in Health and Disease**, 2010.
- BALASUBRAMANIAN, S. P. et al. **Candidate gene polymorphisms in solid cancers** *European Journal of Surgical Oncology*, 2004.
- BROOKS-WILSON, A. R. Genetics of healthy aging and longevity. **Human Genetics**, v. 132, n. 12, p. 1323–1338, 2013.
- BROWNER, W. S. et al. The genetics of human longevity. **The American journal of medicine**, v. 117, n. 11, p. 851–860, 2004.
- CAMARANO, A. A.; KANSO, S. As instituições de longa permanência para idosos no Brasil. **Revista Brasileira de Estudos de População**, 2010.
- CAMPOS, A. C. V. et al. Healthy aging profile in octogenarians in Brazil. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, 2016.
- CAPRI, M. et al. **The genetics of human longevity**. Annals of the New York Academy of Sciences. **Anais...**2006
- CHANDRA, T. et al. Sequence Homology between Human  $\alpha$ 1-Antichymotrypsin,  $\alpha$ 1-Antitrypsin, and Antithrombin III. **Biochemistry**, 1983.
- CHELBI, S. T. et al. Genetic and epigenetic mechanisms collaborate to control SERPINA3 expression and its association with placental diseases. **Human Molecular Genetics**, 2012.
- DATO, S. et al. The genetic component of human longevity: New insights from the analysis of pathway-based SNP-SNP interactions. **Aging cell**, v. 17, n. 3, p. e12755, 2018.
- DELUTY, J. A. et al. The influence of gender on inheritance of exceptional longevity. **Aging**, 2015.
- ESZLARI, N. et al. Distinct effects of folate pathway genes MTHFR and MTHFD1L on ruminative response style: a potential risk mechanism for depression. **Translational psychiatry**, v. 6, n. 3, p. e745, 2017.
- FLACHSBART, F. et al. Identification and characterization of two functional variants in the human longevity gene FOXO3. **Nature Communications**, 2017.

GREEN, R. et al. Vitamin B 12 deficiency. **Nature reviews Disease primers**, v. 3, p. 17040, 2017.

GURALNIK, J. M. et al. Prevalence of anemia in persons 65 years and older in the United States: Evidence for a high rate of unexplained anemia. **Blood**, 2004.

HERSKIND, A. M. et al. The heritability of human longevity: A population-based study of 2872 Danish twin pairs born 1870-1900. **Human Genetics**, 1996.

HUGHES, K. A.; REYNOLDS, R. M. EVOLUTIONARY AND MECHANISTIC THEORIES OF AGING. **Annual Review of Entomology**, 2005.

IBGE. Tábua Completa de Mortalidade para o Brasil - 2017. Breve análise da evolução da mortalidade no Brasil. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, 2018.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <https://brasilemsintese.ibge.gov.br/populacao/distribuicao-da-populacao-por-sexo.html>. Acesso em 07 dez. 2018a.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/apps/populacao/projecao/>. Acesso em 05 dez. 2018b.

KACHAR, V. Envelhecimento e perspectivas de inclusão digital. **Revista Kairós Gerontologia**, 2010.

KAEBERLEIN, M. The Biology of Aging: Citizen Scientists and Their Pets as a Bridge Between Research on Model Organisms and Human Subjects. **Veterinary Pathology**, 2016.

KATHIRESAN, S. et al. Genome-wide association of early-onset myocardial infarction with single nucleotide polymorphisms and copy number variants. **Nature Genetics**, 2009.

KENYON, C. J. The genetics of ageing. **Nature**, 2010.

LEE, D. et al. Folate cycle enzyme MTHFD1L confers metabolic advantages in hepatocellular carcinoma. **Journal of Clinical Investigation**, 2017.

LIU, W. et al. Polymorphism rs4934 of SERPINA3 and sporadic intracranial aneurysms in the chinese population. **Cerebrovascular Diseases**, 2009.

LUO, D. et al. Serpin peptidase inhibitor, clade A member 3 (SERPINA3), is overexpressed in glioma and associated with poor prognosis in glioma patients. **OncoTargets and Therapy**, 2017.

MA, W. et al. Adult height, dietary patterns, and healthy aging. **American Journal of Clinical Nutrition**, 2017.

MOMB, J. et al. Deletion of Mthfd1l causes embryonic lethality and neural tube and

craniofacial defects in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2013.

MOSKALEV, A. A. et al. **Genetics and epigenetics of aging and longevity** *Cell Cycle*, 2014.

OLSHANSKY, S. J. **Articulating the Case for the Longevity Dividend\*** *American Journal of Lifestyle Medicine*, 2014.

PALMER, B. R. et al. Genetic polymorphism rs6922269 in the MTHFD1L gene is associated with survival and baseline active vitamin B12 levels in post-acute coronary syndromes patients. **PLoS ONE**, 2014.

PARLE-MCDERMOTT, A. et al. A common variant in MTHFD1L is associated with neural tube defects and mRNA splicing efficiency. **Human Mutation**, 2009.

PATRICIO, K. P. et al. O segredo da longevidade segundo as percepções dos próprios longevos. **Ciência & Saúde Coletiva**, 2008.

PIKE, S. T. et al. Mitochondrial C1-tetrahydrofolate synthase (MTHFD1L) supports the flow of mitochondrial one-carbon units into the methyl cycle in embryos. **Journal of Biological Chemistry**, 2010.

PRASANNAN, P. et al. Human Mitochondrial C1-Tetrahydrofolate Synthase: Gene structure, tissue distribution of the mRNA, and immunolocalization in Chinese hamster ovary cell. **Journal of Biological Chemistry**, 2003.

PRASANNAN, P.; APPLING, D. R. Human mitochondrial C1-tetrahydrofolate synthase: Submitochondrial localization of the full-length enzyme and characterization of a short isoform. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 2009.

RAFI, M. A.; ALAVI, A. Debate on human aging and lifespan. **BiolImpacts**, v. 7, n. 3, p. 135–137, 2017.

RATTAN, S. I. S. Theories of biological aging: Genes, proteins, and free radicals. **Free Radical Research**, 2006.

RODRIGUEZ, S.; GAUNT, T. R.; DAY, I. N. M. Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studies. **American Journal of Epidemiology**, 2009.

RUBY, J. G. et al. Estimates of the Heritability of Human Longevity Are Substantially Inflated due to Assortative Mating. **Genetics**, 2018.

SAADE, S. et al. Large scale association analysis identifies three susceptibility loci for coronary artery disease. **PloS one**, v. 6, n. 12, p. e29427, 2011.

SCHÄCHTER, F. et al. Genetic associations with human longevity at the APOE and ACE loci. **Nature Genetics**, 1994.



SILVA, W. J. M. DA; FERRARI, C. K. B. Metabolismo mitocondrial, radicais livres e envelhecimento. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, 2012.

SLOWIK, A. et al.  $\alpha$ 1-antichymotrypsin gene (SERPINA3) A/T polymorphism as a risk factor for aneurysmal subarachnoid hemorrhage. **Stroke**, 2005.

TAORMINA, G.; MIRISOLA, M. G. Longevity: epigenetic and biomolecular aspects. **Biomolecular concepts**, v. 6, n. 2, p. 105–117, 2015.

THE POPULATION DIVISION OF THE DEPARTMENT OF ECONOMIC AND SOCIAL AFFAIRS. **World population prospects: the 2017 revision Volume II: Demographic profiles**. [s.l.: s.n.].

VERAS, R. P.; OLIVEIRA, M. Envelhecer no Brasil: a construção de um modelo de cuidado. **Ciência & Saúde Coletiva**, 2018.

VIÑA, J.; BORRÁS, C.; MIQUEL, J. **Theories of ageing**. IUBMB Life. **Anais...2007**  
WERNIMONT, S. M. et al. Folate network genetic variation, plasma homocysteine, and global genomic methylation content: a genetic association study. **BMC Medical Genetics**, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Envelhecimento ativo: uma política de saúde. 2005.

YANG, Y.-S. et al. The role of mitochondrial folate enzyme MTHFD1L in esophageal squamous cell carcinoma. **Scandinavian journal of gastroenterology**, v. 53, n. 5, p. 533–540, 2018.

ZHANG, Y. et al. Effect of ApoA4 on SERPINA3 mediated by nuclear receptors NR4A1 and NR1D1 in hepatocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2017.

ZHOLDYBAYEVA, E. V et al. Genetic Risk Factors for Intracranial Aneurysm in the Kazakh Population. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 66, n. 1, p. 135–145, 2018.

ZHOU, J. et al. Up-regulation of SERPINA3 correlates with high mortality of melanoma patients and increased migration and invasion of cancer cells. **Oncotarget**, 2017.

## ANEXOS

### ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Universidade Federal do Espírito Santo  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

#### I. DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA:

**Título:** Identificação de biomarcadores genéticos da longevidade humana e avaliação da atividade de biopolímero no envelhecimento saudável

**Descrição:** Nas últimas décadas, observou-se um crescimento da população idosa. As pessoas estão chegando aos 90 anos ou mais, saudáveis ou com doenças como diabetes, hipertensão arterial, obesidade, que acometem as articulações, a memória. Pessoas que vivem mais anos, chamadas de longevas, podem ter esse fator associado a causas ambientais (dieta, prática de exercício físico, poluição ambiental) ou genéticas (características herdadas dos pais). Nossa pesquisa, com duração prevista de 8 anos, pretende estudar as causas da longevidade humana. Será necessária a coleta de 20ml de sangue daqueles indivíduos que concordarem em participar da pesquisa. O (a) senhor (a) não é obrigado (a) a participar desse estudo, pois sua participação é voluntária. Contudo, caso possa participar, será muito importante, pois os resultados gerados a partir dessa pesquisa podem dar informações que auxiliem no desenvolvimento de estratégias que busquem melhorar a qualidade de vida das pessoas. Quem quiser participar dessa pesquisa, precisa preencher e assinar esse termo de consentimento.

#### Avaliação do risco da pesquisa:

( ) sem risco            (x) risco mínimo            ( ) risco médio            ( ) risco maior

O risco mínimo refere-se à eventual possibilidade de roxo ou vermelhidão e/ou dor mínima no local da coleta de sangue.

#### II. DIREITOS E GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

O (a) senhor (a) não é obrigado (a) a participar da pesquisa. As pessoas que quiserem participar têm acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive podem fazer perguntas para esclarecer dúvidas. O (a) senhor (a) pode retirar seu consentimento a qualquer momento e a não adesão a esse projeto de pesquisa não implicará em prejuízo de qualquer natureza. Asseguramos que as amostras de seu DNA não serão utilizadas para fins de direito civil e penal (investigação criminal ou identificação humana para paternidade e maternidade), mas apenas para os fins descritos no presente protocolo de pesquisa. Não haverá ônus (gastos) para os participantes da pesquisa. Os resultados dessa pesquisa serão divulgados na comunidade científica. Contudo, a identidade dos participantes não será revelada, garantindo a confidencialidade, sigilo e privacidade do participante. Não estão previstas formas de ressarcimento ou indenizações durante a pesquisa.

#### III. INFORMAÇÕES SOBRE OS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA:

Profa. Flávia de Paula e Geralda Gillian Silva Sena – aluna do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia – UFES. Endereço: Laboratório de Genética Humana e Molecular (LGHM), Departamento de Ciências Biológicas, CCHN/UFES. Av. Marechal Campos, 1468, Campus de Maruípe, Vitória, ES. CEP: 29040-090, Telefone: (27) 3335-7251.

**IV. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA**

NOME:.....Telefone:.....

Data nascimento:...../...../..... Idade: .....Sexo:M ( ) F ( )

Endereço:.....

Etnia/Raça:.....Escolaridade:.....

**Responsável legal (se necessário):**

NOME:.....Idade:.....

Grau de Parentesco:.....Telefone: .....

**V. CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO**

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, sem que tenha sido forçado ou obrigado, consinto em participar do presente protocolo de pesquisa.

( ) Desejo conhecer os resultados dessa pesquisa.

( ) Não desejo conhecer os resultados dessa pesquisa.

Local e data:....., ...../...../.....

Assinatura do participante ou responsável legal

.....

Assinatura do pesquisador responsável:

.....

Em caso de dúvidas, entre em contato com a professora responsável pela pesquisa, Flávia de Paula (telefone: 3335-7251) e para reclamações, com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Espírito Santo (telefone: 3335-7211). **Endereço do Comitê de Ética em Pesquisa:** Av. Marechal Campos, 1468, Campus de Maruípe, Prédio da Administração – UFES, Cep. 29040-090, Vitória, ES.

**Via do Pesquisador****Em duas vias: Via do Participante**

ANEXO B

