



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

André Simões Cadaxo

**Caracterização metabólica de biomarcadores não invasivos circulantes
relacionados à Doença de Alzheimer**

Rio de Janeiro

2022

André Simões Cadaxo

**Caracterização metabólica de biomarcadores não invasivos circulantes relacionados à
Doença de Alzheimer**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-
Graduação em Biociências, da Universidade do
Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Cíntia Barros Santos-Rebouças

Coorientador: Prof. Dr. Gilson Costa dos Santos Júnior

Rio de Janeiro

2022

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

C121 CADAXO, André Simões.
Caracterização metabólica de biomarcadores não invasivos circulantes relacionados à Doença de Alzheimer / André Simões Cadaxo. - 2022.
112 f.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Cíntia Barros Santos-Rebouças
Coorientador: Prof. Dr. Gilson Costa dos Santos Júnior

Mestrado (Dissertação) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Doença de Alzheimer – Diagnóstico – Teses. 2. Biomarcadores – Análise e química. 3. Plasma – Química. 4. Urina – Química. I. Santos-Rebouças, Cíntia Barros. II. Santos Júnior, Gilson Costa dos. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616.89

Bibliotecário: Felipe Caldonazzo
CRB7/7341

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

André Simões Cadaxo

**Caracterização metabólica de biomarcadores não invasivos circulantes relacionados à
Doença de Alzheimer**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-
Graduação em Biociências, da Universidade do
Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 21 de setembro de 2022

Coorientador: Prof. Dr. Gilson Costa dos Santos Júnior
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora: _____
Prof.^a Dra. Cíntia Barros Santos-Rebouças (Orientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Teresa de Souza Fernandez Seixas
Instituto Nacional de Cancer

Prof.^a Dra. Dayse Aparecida da Silva
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2022

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Othilio e Maria Carlota, a minha avó Carlota e ao meu irmão Pedro.

AGRADECIMENTOS

À toda minha família. Obrigado pelo carinho e por todo o apoio. Não teria chegado até onde cheguei sem vocês.

À Professora Cíntia com quem tive a honra de trabalhar novamente. Sempre muito solícita, com muita paciência. Uma grande mentora. Não teria conseguido realizar esse trabalho sem a sua orientação. Muito obrigado por todo o apoio.

Ao professor Gilson, por me orientar nesse novo universo da metabolômica, seu conhecimento, apoio e ensinamentos foram essenciais para a realização deste trabalho. Muito obrigado.

Ao Dr. Daniel Simplicio. Um incrível profissional que me ensinou muito e foi parte muito importante deste trabalho. Sem você não teria sido possível.

À professora Luciana Motta por todo auxílio e a todos os médicos e funcionários do ambulatório de geriatria da UnATI e do ambulatório de neurologia da PPC.

Aos amigos Minero e Filipi por todos os anos de amizade e parceria.

Ao meu amigo Vinicius *In Memoriam*. Nossos momentos de amizade serão eternos.

Às minhas queridas amigas princesas: Ana, Carol, Jéssyca, Iasmim, Luana e Pillar por serem as melhores amizades que eu fiz na UERJ. Anos se passam e continuamos juntos.

À todo pessoal do SERVGEN. Em especial a Camilla, Bianca, Jussara, Veluma e Andressa. Além de colegas, amigas queridas. Sempre me deram suporte e ombro amigo nos momentos mais difíceis e sempre estiveram dispostas a me ajudar. Fica muito fácil trabalhar com pessoas queridas assim.

Um agradecimento especial a mais nova integrante do grupo e minha grande dupla Juliana. Minha parceira de ambulatórios e hospitais em busca de pacientes. Viagens pra lá e pra cá desesperados pra conseguir fazer os experimentos. Muitos momentos de sofrência compartilhada. Muito obrigado por toda a ajuda, querida! Meu sucesso também é seu!

À Nala, Jane e Zuca por todos os anos que me alegraram com sua companhia.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À todos os pacientes voluntários que aceitaram participar deste trabalho.

À todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram a chegar aonde cheguei. Obrigado!

Em algum lugar, algo incrível está esperando para ser descoberto.

Carl Sagan

RESUMO

CADAXO, André Simões. *Caracterização metabólica de biomarcadores não invasivos circulantes relacionados à Doença de Alzheimer*. 2022. 112 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

A expectativa de vida da população mundial vem aumentando consideravelmente, o que repercute na preocupação crescente com doenças neurológicas da Terceira e da Quarta idades, como a doença de Alzheimer (DA). A DA é definida como uma doença de progressão lenta, caracterizada por perda neuronal gradual, déficit cognitivo, presença de placas amiloides (PAs) e emaranhados neurofibrilares (ENFs). Antes do desenvolvimento da DA em si, existe uma fase prodrômica chamada de Déficit Cognitivo Mínimo (DCM). A metabolômica é uma abordagem biológica recente, através da qual a concentração de diversos metabólitos presentes em amostras biológicas pode ser medida. Mudanças entre os perfis metabólicos podem refletir diferenças no *background* genético, modificações epigenéticas, aspectos transcriptômicos e proteômicos, dieta, estilo de vida, microbiota intestinal, estresse, exposição a patógenos, medicamentos, entre outros. No presente estudo, tivemos como objetivo principal identificar biomarcadores circulantes não invasivos (urina) e pouco invasivos (plasma) de desenvolvimento e/ou progressão da DA tardia, através da análise metabolômica comparativa por Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Para tal, foram selecionados 37 idosos (>65 anos) para participação voluntária no estudo, sendo 11 diagnosticados com DCM, 12 diagnosticados com DA provável tardia e 14 idosos saudáveis. A análise comparativa entre os grupos evidenciou metabólitos com participação no metabolismo energético, atividade neuroprotetora, neuromodulação, modulação de proteínas, inflamação ou lesões características, metabolismo de lipídeos e colesterol, metabolismo da metionina, além de influência da microbiota intestinal. Foram encontrados biomarcadores circulantes associados ao desenvolvimento e progressão da DA. Vias metabólicas foram relacionadas aos compostos alterados assim como genes previamente relacionados à patologia. Também foram identificadas variantes gênicas sem associação prévia com a DA. Os resultados obtidos nesse estudo sugerem a associação dos compostos alterados com as respectivas vias metabólicas onde exercem sua influência no desenvolvimento e progressão da doença. As informações adquiridas servem como um ponto de partida para futuras investigações com melhor direcionamento e maior profundidade.

Palavras-chave: Envelhecimento. Doença de Alzheimer. Declínio Cognitivo Mínimo. Metabolômica. Biomarcadores circulantes. Diagnóstico.

ABSTRACT

CADAXO, André Simões. Metabolic characterization of non-invasive circulating biomarkers related to Alzheimer's Disease. 2022. 112 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

The life expectancy of the world's population has been increasing considerably, which leads to a growing concern about diseases in old age, such as Alzheimer's disease (AD). AD is defined as a slowly progressing disease, characterized by gradual neuronal loss, cognitive deficit, presence of amyloid plaques (AP) and neurofibrillary tangles (NFT). Before the development of AD itself, there is a prodromal phase called Minimal Cognitive Impairment (MCI). Metabolomics is a recent biological approach, through which the concentration of various metabolites present in biological samples can be measured. Changes between metabolic profiles may reflect differences in genetic background, epigenetic modifications, transcriptomic and proteomic aspects, diet, lifestyle, gut microbiota, stress, exposure to pathogens, medications, among others. In the present study, we aimed to identify non-invasive (urine) and less invasive (plasma) circulating biomarkers of the development and/or progression of late AD, through comparative metabolomics analysis by Nuclear Magnetic Resonance (NMR). To this end, 37 elderly people (>65 years old) were selected for voluntary participation in the study, 11 of whom were diagnosed with MCI, 12 diagnosed with late probable AD and 14 healthy elderly individuals. The comparative analysis between the groups showed metabolites with roles in energy metabolism, neuroprotective activity, neuromodulation, protein modulation, inflammation or pathological lesions, lipid and cholesterol metabolism, methionine metabolism, in addition to the influence of the gut microbiota. Circulating biomarkers associated with the development and progression of AD were found. Metabolic pathways were related to the altered compounds as well as genes previously related to the pathology. Gene variants without previous association with AD were also identified. The results obtained in this study suggest association between the altered compounds with the respective metabolic pathways where they exert their influence on the development and progression of the disease. The information acquired serves as a starting point for future research with better direction and greater depth.

Keywords: Aging. Alzheimer's disease. Mild Cognitive Impairment. Metabolomics. Circulating biomarkers. Diagnosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Estrutura fisiológica do cérebro e neurônios.....	22
Figura 2 –	Acúmulo de proteínas β A neurotóxicas na região extracelular de neurônios.....	24
Figura 3 –	Desestruturação dos microtúbulos e formação dos emaranhados neurofibrilares.....	25
Figura 4 –	A metabolômica como cerne de outras ciências ÔMICAs.....	38
Figura 5 –	Espectros plasmáticos obtidos de um indivíduo de cada grupo.....	50
Figura 6 –	Espectros urinários obtidos de um indivíduo de cada grupo.....	51
Figura 7 –	Normalização dos dados de plasma pela plataforma MetaboAnalyst.....	52
Figura 8 –	Normalização dos dados de urina pela plataforma MetaboAnalyst.....	53
Figura 9 –	Análise de componentes principais (PCA) nas amostras de plasma pela plataforma MetaboAnalyst.....	54
Figura 10 –	Análise do componente principal (PCA) nas amostras de urina pela plataforma MetaboAnalyst.....	55
Figura 11 –	Análise de SAM para metabólitos plasmáticos com diferença significativa entre os três grupos.....	56
Figura 12 –	Metabólitos plasmáticos com variação de concentração significativa.....	58
Figura 13 –	A análise de SAM de metabólitos urinários com diferença significativa entre os grupos.....	60
Figura 14 –	Metabólitos urinários com variação de concentração significativa.....	62
Figura 15 –	Análise de enriquecimento de processos biológicos para os metabólitos diferencialmente expressos no plasma entre os pacientes com DCM e controles.....	68
Figura 16 –	Análise de enriquecimento de processos biológicos para os metabólitos plasmáticos diferencialmente expressos entre os pacientes com DA (grupo 2) e controles (grupo 3).....	69
Figura 17 –	Principal subrede observada na rede de interação entre genes e os compostos plasmáticos identificados na comparação entre a amostra de pacientes com DA (grupo 2) e controles (grupo 3).....	70

Figura 18 – Visão Geral da análise de SNVs enriquecidas para o grupo de metabólitos relevantes.....	71
Figura 19 – Análise de enriquecimento de processos biológicos para os metabólitos diferencialmente expressos na urina entre os pacientes com DCM e controles.....	72
Figura 20 – Principal subrede observada na rede de interação entre genes e os compostos urinários identificados na comparação entre a amostra de pacientes com DA (grupo 2) e controles (grupo 3).....	74
Figura 21 – Interação das vias metabólicas entre si com os metabólitos significativamente alterados.....	90

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	CrITÉrios do NINCDS-ADRDA para classificaÇão dos pacientes com DA provável, possível ou definitiva.....	26
Quadro 2 –	Características das duas principais plataformas analíticas utilizadas na metabolômica.....	40
Quadro 3 –	Testes neuropsicológicos normatizados para a população brasileira utilizados na avaliação de pacientes com DCM e DA.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Metabólitos plasmáticos identificados com diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos através da análise SAM.....	57
Tabela 2 –	Metabólitos urinários identificados com diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos através da análise de SAM.....	61
Tabela 3 –	Compostos metabólicos plasmáticos significativamente alterados ($p < 0,05$) na comparação entre pacientes com DCM (grupo 1) e controles (grupo 3)....	64
Tabela 4 –	Compostos metabólicos plasmáticos significativamente alterados ($p < 0,05$) na comparação entre pacientes com DA (grupo 2) e controles (grupo 3).....	65
Tabela 5 –	Compostos metabólicos plasmáticos significativamente alterados ($p < 0,05$) na comparação entre pacientes com DA (grupo 2) e DCM (grupo 1).....	66
Tabela 6 –	Compostos metabólicos urinários significativamente alterados ($p < 0,05$) na comparação entre controles (grupo 3) e pacientes com DCM (grupo 1).....	66
Tabela 7 –	Compostos metabólicos urinários significativamente alterados ($p < 0,05$) na comparação entre pacientes com DA (grupo 2) e controles (grupo 3).....	67
Tabela 8 –	Compostos metabólicos urinários significativamente alterados ($p < 0,05$) na comparação entre pacientes com DA (grupo 2) e com DCM (grupo 1).....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-hmC	5-hidroximetilcitosina
5-mC	5-metilcitosina
ABCA7	<i>ATP Binding Cassette Subfamily A Member 7</i>
AC	acilcarnitina
ADI	<i>Alzheimer's Disease International</i>
ADNI	<i>Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative</i>
AGE	produtos finais da glicação avançada
AGT	Angiotensinogênio
ALDH4A1	<i>Aldehyde Dehydrogenase 4 Family Member A1</i>
ALDH4A2	<i>Aldehyde Dehydrogenase 4 Family Member A2</i>
AMP	Adenosina Mono fosfato
AOX1	<i>Aldehyde Oxidase 1</i>
APOE	apolipoproteína E
APP	proteína precursora amiloide
ARFGEF2	<i>ADP Ribosylation Factor Guanine Nucleotide Exchange Factor 2</i>
ATC	Ácido Tricarboxílico
ATP	Adenosina Trifosfato
AVE	Acidente Vascular Encefálico
BACE1	beta secretase
BDH1	<i>3-Hydroxybutyrate Dehydrogenase 1</i>
BHE	Barreira Hemato Encefálica
CENABIO	Centro Nacional de Biologia Estrutural e Bioimagem
CERAD	<i>Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease</i>
CLU	Clusterina
CYCS	<i>Cytochrome C, Somatic</i>
DA	Doença de Alzheimer
DAC	Doença Arterial Coronariana
DALY	<i>Disability Adjusted Life Years</i>
DAP	Doença Arterial Periférica

DCM	Declínio cognitivo mínimo
DMAA	Dimetilarginina assimétrica
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DYRK1	Tirosina quinase de dupla especificidade regulada por fosforilação
EM	Espectrometria de Massa
ENFs	Emaranhados Neurofibrilares
FAG	Fenilacetilglutamina
FCE	Fluido Cerebroespinal
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GPR41	<i>G protein-coupled receptor 41</i>
GTP	Guanosina Trifosfato
GWAS	<i>Genome Wide Association Studies</i>
HDAC9	Histona Desacetilase
HMDB	<i>Human Metabolome Database</i>
HSD17B12	<i>Hydroxysteroid 17-Beta Dehydrogenase 12</i>
HSV-1	Herpes Virus tipo 1
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IL - 8	Interleucina 8
IL- 10	Interleucina 10
IL- 6	Interleucina 6
IRS-1	Substrato do Receptor de Insulina 1
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
KRAS	oncogene viral do sarcoma de rato Kirsten
lnRNA	RNA longo não codificante
LCR	Líquido Cefaloraquidiano
MEEM	Mini Exame de Estado Mental
miRNA	microRNA
mRNA	RNA mensageiro
MTHFD1L	<i>Methylenetetrahydrofolate Dehydrogenase (NADP+ Dependent) 1 Like</i>
NAAQSs	<i>National Ambient Air Quality Standards</i>
NAD	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NADP+	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida
NIA	<i>National Institute on Aging</i>
NINCDS-ADRDA	<i>National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke; Alzheimer's Disease and Related Disorders Association Work Group</i>
NIT2	<i>Nitrilase Family Member 2</i>
NOTCH1	<i>Neurogenic locus notch homolog protein 1</i>
NR3C2	<i>Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 2</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	Placas amilóides
PCA	Análise de Componentes Principais
PDG	Purinas derivadas de guanina
PET	Tomografia por emissão de pósitrons
PPC	Policlínica Piquet-Carneiro
PSEN1	presenilina 1
PSEN2	presenilina 2
PTRPRD	Receptor Proteína Tirosina Fosfatase Tipo Delta
RAB1A	RAS Oncogene Family 1A
RAGE	Receptor da AGE
RELN	<i>Reelin</i>
RHOA	família A homóloga Ras
RMN	Ressonância magnética nuclear
RNA	Ácido Ribonucleico
SAM	Análises de Significância de Metabólitos
SLC2A4RG	<i>solute carrier family 2 member 4 gene</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SNV	<i>Single Nucleotide Variant</i>
SORD	<i>Sorbitol Dehydrogenase</i>
STITCH	<i>search tool for interactions of chemicals</i>
TG	Tolerância à Glicose
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
tRNA	RNA transportador
TXN	<i>Thioredoxin</i>

UNATI	Universidade Aberta da Terceira Idade
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
β A	Proteína beta amilóide

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
<	Menor que
>	Maior que
≥	Maior ou igual
±	Mais ou menos
∞	Infinito
+	Soma
-	Subtração
×	Multiplicação
X	Vezes
V	Volts
®	Marca registrada
™	<i>Trade mark</i>
α	alfa
β	beta
ε	epsilon
γ	gama
KDa	KiloDalton
ppm	Partes por milhão
pb	pares de bases
kb	Kilobase
°C	Graus Celsius
DSS	4,4-dimetil-4-silapentano-1-sulfônico
D2O	Água Deuterada
H ₂ O	Molécula da água
mL	Mililitro
μL	Micro litro
mM	Milimolar
μM	Micromolar
ng	Nanograma

min	Minutos
seg	Segundos
U	Unidades
mhz	Megahertz

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	20
1	OBJETIVOS.....	43
1.1	Objetivo Geral.....	43
1.2	Objetivos Específicos.....	43
2	METODOLOGIA.....	44
2.1	Considerações Éticas.....	44
2.2	Casuística.....	44
2.3	Critérios de Inclusão/Exclusão.....	44
2.4	Preparo de Amostras.....	46
2.5	Análises Metabolômicas.....	47
2.6	Análises de Enriquecimento.....	48
3	RESULTADOS.....	49
3.1	Características gerais dos grupos.....	49
3.2	Qualidade dos espectros e normalização dos dados.....	49
3.3	Análise de componentes principais.....	54
3.4	Análise de significância de metabólitos.....	56
3.4.1	<u>Plasma.....</u>	56
3.4.2	<u>Urina.....</u>	60
3.5	Teste de Mann-Whitney.....	64
3.5.1	<u>Plasma.....</u>	64
3.5.2	<u>Urina.....</u>	66
3.6	Análises de enriquecimento e redes de interação.....	67
3.6.1	<u>Plasma.....</u>	67
3.6.2	<u>Urina.....</u>	72
4	DISCUSSÃO.....	75
4.1	Plasma.....	75
4.1.1	<u>Lípideos.....</u>	75
4.1.2	<u>Guanina.....</u>	76
4.1.3	<u>Dimetilamina.....</u>	77
4.1.4	<u>Lactato.....</u>	78

4.1.5	<u>Sarcosina</u>	79
4.1.6	<u>Cilo-Inositol</u>	80
4.1.7	<u>Tirosina</u>	81
4.1.8	<u>Acetato</u>	81
4.2	Urina	82
4.2.1	<u>Ácido Oxalacético</u>	82
4.2.2	<u>Ácido 2,3 Diidroxivalérico</u>	83
4.2.3	<u>3-hidroxibutirato</u>	83
4.2.4	<u>D-Salicina</u>	84
4.2.5	<u>Ácido Isocapróico</u>	85
4.2.6	<u>Fenilacetilglutamina</u>	85
4.2.7	<u>Ácido Valpróico</u>	86
4.2.8	<u>NADP+</u>	86
4.2.9	<u>L-asparagina</u>	87
4.2.10	<u>Isobutiril L-carnitina</u>	88
4.3	Principais vias metabólicas relacionadas	89
	CONCLUSÃO	92
	REFERÊNCIAS	93
	APÊNDICE A - Metabólitos plasmáticos com variação entre os grupos 1 e 3.....	105
	APÊNDICE B - Metabólitos plasmáticos com variação entre os grupos 2 e 3.....	106
	APÊNDICE C - Metabólitos plasmáticos com variação entre os grupos 1 e 2.....	107
	APÊNDICE D - Metabólitos urinários com variação entre os grupos 1 e 3.....	108
	APÊNDICE E - Metabólitos urinários com variação entre os grupos 2 e 3.....	108
	APÊNDICE F - Metabólitos urinários com variação entre os grupos 1 e 2.....	109
	ANEXO A - Certificado de Aprovação de Avaliação Ética (CAAE).....	110
	ANEXO B - Termo de consentimento livre e esclarecido.....	111

INTRODUÇÃO

Expectativa de Vida e Envelhecimento

Ao longo das últimas décadas, a expectativa de vida da população mundial vem aumentando consideravelmente. De acordo com dados do relatório de 2022 da Organização Mundial de Saúde (OMS), no período entre 2000 e 2019, a expectativa de vida da população mundial aumentou em uma média de 6,5 anos (OMS, 2022). No Brasil, no período de 2012 até o início de 2018, a população de idosos aumentou em 4,8 milhões, o que corresponde a um crescimento de 18% nesse grupo etário, segundo os dados mais recentes do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2018). Esse aumento global no número de idosos, também observado na população brasileira, é reflexo dos avanços tecnológicos na medicina diagnóstica e preventiva, o que tem propiciado uma melhora progressiva em nossa qualidade de vida. Contudo, a ampliação no número de idosos gera uma necessidade crescente de implementação de estratégias de saúde pública relacionadas a doenças neurológicas da Terceira e da Quarta idades, dentre as quais destaca-se a Doença de Alzheimer (DA), a principal forma de demência (Scheltens *et al.*, 2021).

Atualmente, cerca de 50 milhões de pessoas convivem com algum tipo de demência, e esse número deve triplicar até o ano de 2050 (OMS, 2022). Dentre os diferentes tipos de demência, a DA corresponde a aproximadamente 60 a 70% dos casos (*National Institute on Aging*, NIA, 2021). De acordo com o relatório da *Alzheimer's Disease International* (ADI, 2019), os custos anuais com indivíduos com demência mundialmente são de um trilhão de dólares, e esse valor deve chegara dois trilhões em 2030.

Em maio de 2017, a OMS adotou um plano de ação global para intervenções na saúde pública, em resposta aos crescentes casos de demência, recomendando que os países integrantes da OMS implementassem políticas de combate à doença até 2025. O plano fornece um planejamento abrangente de ações voltadas para formuladores de políticas, parceiros internacionais, regionais e nacionais, com foco nas seguintes áreas: abordar a demência como uma prioridade na saúde pública; aumentar a conscientização sobre a demência e estabelecer iniciativas favoráveis à redução do risco de demência; diagnóstico, tratamento e cuidados; criar sistemas de informação sobre demência; fornecer apoio a cuidadores de pacientes acometidos por demência; promover pesquisa e inovação. Entretanto, desde a elaboração deste plano de

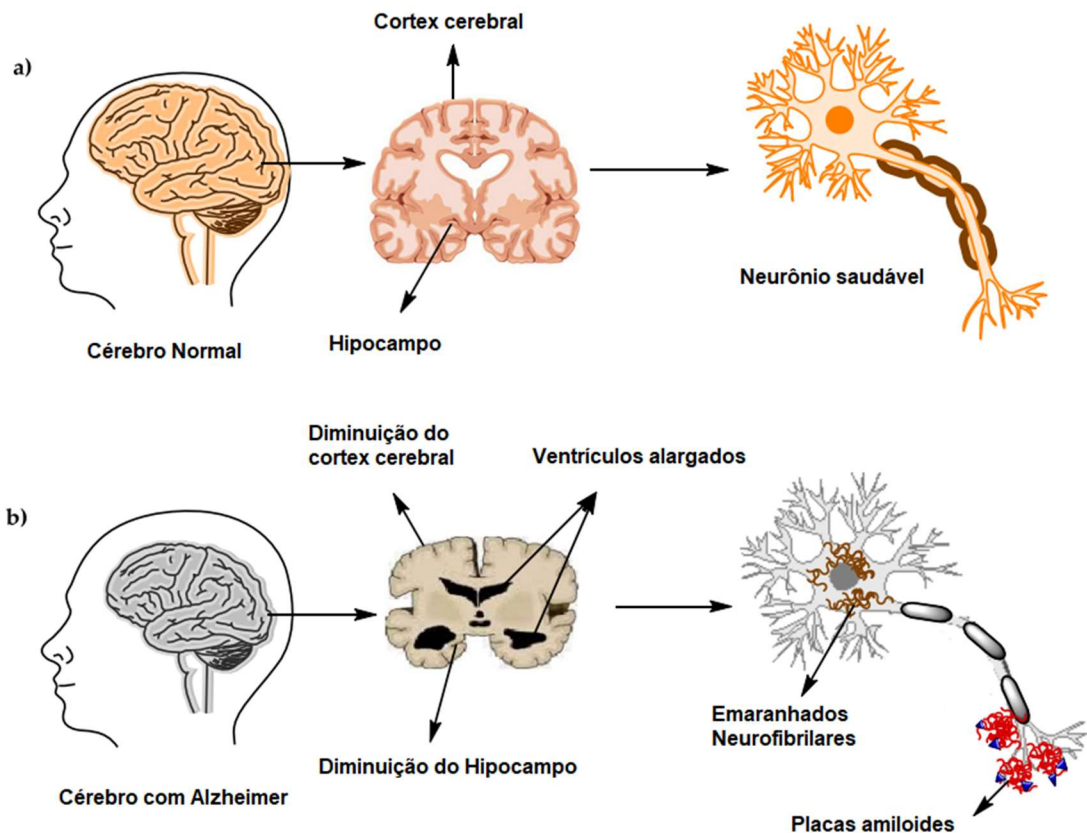
combate à demência, o Qatar foi o único país a desenvolver um novo plano de ação (OMS, 2017; ADI, 2021).

Além da DA vir se tornando uma das doenças mais incidentes e custosas do século, esta condição também representa uma grande carga emocional, tanto para os pacientes quanto para seus familiares (Scheltens *et al.*, 2021). Os anos de vida perdidos ajustados por incapacidade (*Disability Adjusted Life Years*, DALY) em pacientes com DA e outros tipos de demência em relação à população mundial quase triplicou. No ano 2000, o DALY era de 12.760 e até a última medição, no ano de 2019, esse número chegou a 28.353 (OMS, 2019).

A Doença de Alzheimer

A DA é considerada a doença neurodegenerativa mais comum e pode ser definida como uma doença de progressão lenta, caracterizada por uma perda significativa das sinapses e perda neuronal gradual nas regiões cerebrais responsáveis por funções cognitivas, incluindo o córtex cerebral, o hipocampo, o córtex entorrinal e o estriado ventral (National institute on aging, 2019; Breijyeh *et al.*, 2020). As duas características histopatológicas cerebrais principais observadas em indivíduos com DA são a presença de placas amiloides (PAs) extracelulares e emaranhados neurofibrilares (ENFs) intracelulares (Lane *et al.*, 2017, NIA, 2021). Por consequência, também ocorrem inflamações neuronais paralelamente a astroglioses reativas e ativação microglial (Lane *et al.*, 2017) (**Figura 1**).

Figura 1: Estrutura fisiológica do cérebro e neurônios



Legenda: (a) indivíduo saudável e (b) portador da doença de Alzheimer.

Fonte: Breijyeh e colaboradores (2020) com modificações.

As PAs são depósitos extracelulares de proteína β A com diferentes morfologias, incluindo placas do tipo neuríticas, difusas, densas ou clássicas e compactas (**Figura 2**). Enzimas de clivagem proteolítica, como β -secretases e γ -secretases, são responsáveis pela biossíntese da proteína precursora de amiloide transmembrana (APP) (Perl *et al.*, 2010; Breijyeh *et al.*, 2020). Essas enzimas clivam a APP em fragmentos de: 43, 45, 46, 48, 49 e 51 aminoácidos, que atingem as formas finais β A40 e β A42. A única diferença entre as duas formas são dois resíduos na região C-terminal da β A42. A concentração de β A40 no líquido é bem maior que a de β A42. Entretanto, a β A42 é o principal componente das PAs no cérebro, enquanto a β A40 só está presente em pequenas concentrações (Gu *et al.*, 2013). Essas evidências sugerem que a deposição de β A42 precede a de β A40, e que a deposição inicial de β A42 não envolve a β A40 (Tiwari *et al.*, 2019).

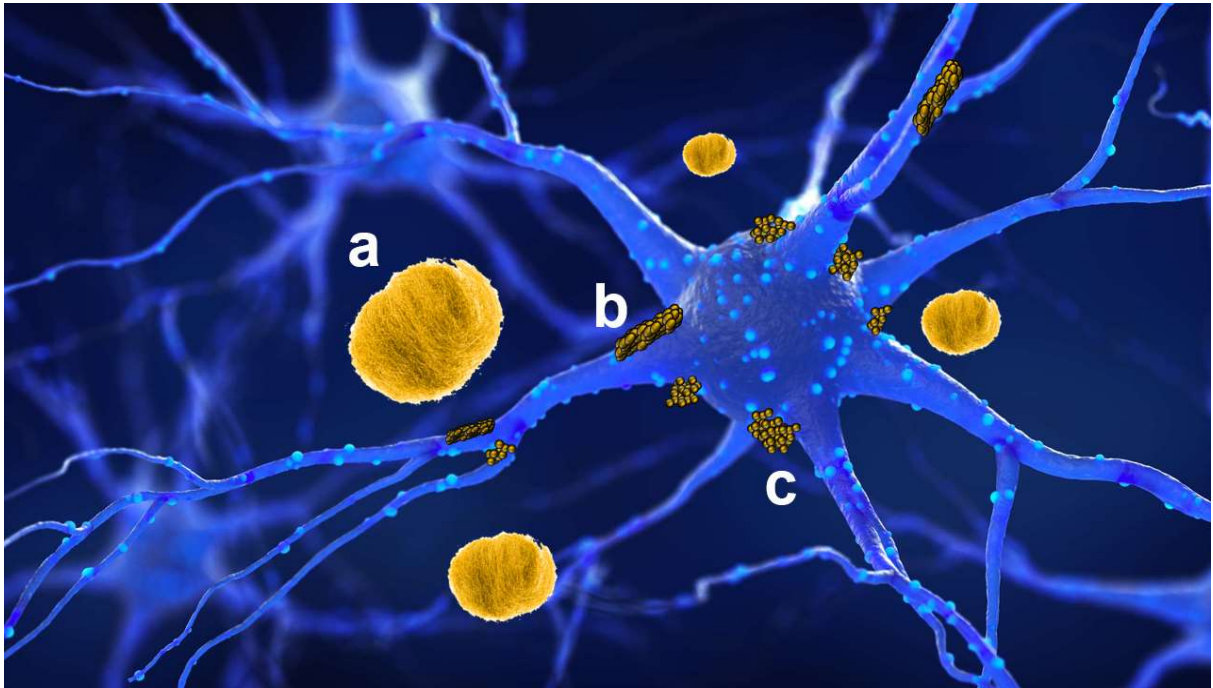
Diante do exposto, uma concentração reduzida de β A42 no líquido pode ser utilizada como um biomarcador para diagnóstico da DA ou maior risco de progressão de Declínio

Cognitivo Mínimo para a DA (Hansson *et al.*, 2019). Trabalhos recentes, no entanto, recomendam que além da análise da concentração de β A42 também deve ser realizada uma análise da razão β A42/ β A40, já que os níveis de concentração de β A42 por si só podem, comparativamente, parecer reduzidos em indivíduos que apresentam naturalmente baixos níveis de proteína β A (Dumurgier *et al.*, 2015; Lehmann *et al.*, 2018).

Existem vários tipos de monômeros de proteína β A, incluindo grandes fibrilas amilóides insolúveis que se acumulam, formando as PAs, e oligômeros solúveis que podem se espalhar por todo o cérebro. A toxicidade relativa de fibrilas e oligômeros é uma área de investigação ativa (Bao *et al.*, 2012). Pesquisas sugerem que ambas as formas apresentam toxicidade, embora exista um consenso crescente de que oligômeros amiloides seriam os mais prejudiciais (Cleary *et al.*, 2005; Reiss *et al.*, 2018).

Embora a proteína β A monomérica em concentrações fisiológicas aparente não seja tóxica, algumas evidências apontam para oligômeros de baixo peso molecular como sendo os agentes neurotóxicos primários na DA. Portanto, as PAs funcionariam como uma forma de proteção do organismo contra a toxicidade dos oligômeros (Glabe *et al.*, 2008; Reiss *et al.*, 2018). A proteína β A desempenha um papel importante na neurotoxicidade e na função neural. O acúmulo de placas mais densas no hipocampo, amígdala e córtex cerebral pode causar estimulação de astrócitos e microglia, danos a axônios, dendritos e perda de sinapses, além de deficiência cognitiva (Armstrong *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2017).

Figura 2: Acúmulo de proteínas β A neurotóxicas na região extracelular de neurônios

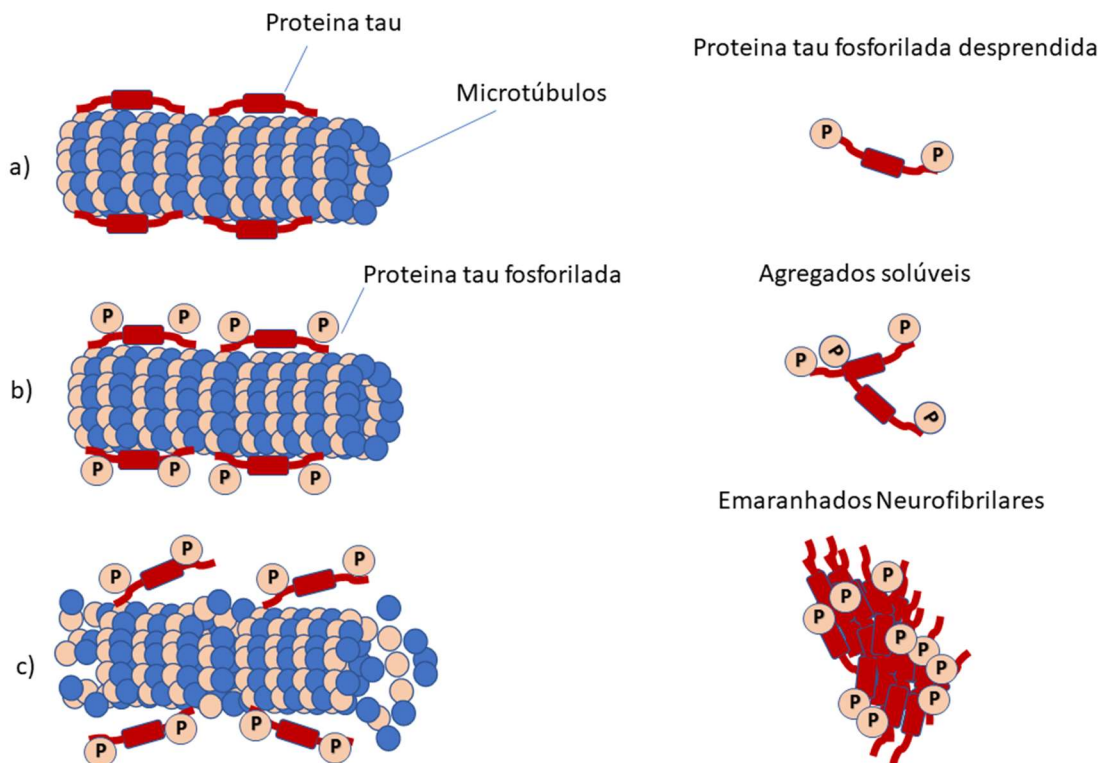


Legenda: Ilustração digital feita através do *software* PowerPoint em escala aumentada, demonstrando o acúmulo de proteínas β A neurotóxicas na região extracelular de neurônios. a) Placas amiloides, b) Fibrilas amiloides insolúveis, c) Oligômeros solúveis.

Fonte: o autor

Neurônios que contêm ENFs apresentam perdas no citoesqueleto dos microtúbulos e nas proteínas associadas a tubulinas (DeTure & Dickson, 2019). Embora os mecanismos moleculares específicos que ligam a perda de elementos do citoesqueleto ao desenvolvimento de ENFs permaneçam incertos, é provável que as vias de transdução de sinais que envolvem a fosforilação e a desfosforilação de proteínas sejam suscetíveis a desempenhar um papel central na formação de lesões neurofibrilares (Metaxas *et al.*, 2016). Sendo assim, a principal constituinte dos ENFs, a proteína tau associada a microtúbulos (Mapt), é anormalmente hiperfosforilada no cérebro de pacientes com DA, em comparação com indivíduos não dementes (Zempel & Mandelkow, 2014). A hiperfosforilação ocorre durante o curso da DA e é conhecida por fundamentar a desorientação da tau de uma região axonal primária para uma região somatodendrítica nos neurônios. Estima-se que essa alteração contribui não apenas para a desregulação da dinâmica dos microtúbulos, mas também para polimerização e agregação da proteína tau (Alonso *et al.*, 2008; DeTure & Dickson, 2019) (**Figura 3**). Portanto, investigar os mecanismos moleculares por trás das causas e consequências da hiperfosforilação da tau pode levar a uma melhor compreensão do papel da proteína na formação dos ENFs, e elucidar ainda mais a conexão entre a deposição de ENFs, a perda sináptica e o déficit de memória na DA.

Figura 3: Desestruturação dos microtúbulos e formação dos emaranhados neurofibrilares



Legenda: Ilustração digital feita no software PowerPoint demonstrando a desestruturação dos microtúbulos e formação dos emaranhados neurofibrilares. a) microtúbulos normais; b) proteína tau hiperfosforilada, devido a um desequilíbrio entre quinases e fosfatases; c) desprendimento das proteínas tau, provocando ruptura na estrutura dos microtúbulos. Proteínas tau desprendidas se agregam e formam emaranhados neurofibrilares intracelulares.

Fonte: o autor

Curiosamente, a formação de ENFs e a perda de sinapses estão associadas durante o curso da DA, e cada um desses processos correlaciona-se com o declínio cognitivo, demonstrando que essas lesões na DA ocorrem de forma conectada e não independente. Evidências sugerem que os ENFs apresentam maior impacto sobre o declínio cognitivo do que as PAs (Metaxas *et al.*, 2016; DeTure *et al.*, 2019).

Em 2011, o *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke; Alzheimer's Disease and Related Disorders Association Work Group* (NINCDS-ADRDA) atualizou os critérios NINCDS-ADRDA de 1984 (McKhann *et al.*, 2011), visando uma maior especificidade e sensibilidade no diagnóstico da DA. Os critérios propostos incluem a classificação da DA em três categorias: possível, provável e definitiva (**Quadro 1**).

Como os sintomas clínicos da DA se sobrepõem aos de outras doenças do sistema nervoso central (SNC), um paciente sob suspeita de apresentar DA deve ser submetido a uma

gama de exames clínicos e laboratoriais, incluindo exames neurológicos, ressonância magnética (RM) do crânio, avaliação do histórico médico e familiar dos pacientes, dosagem de vitamina B12, dentre outros (Neugroschl *et al.*, 2011; Cho *et al.*, 2018). A deficiência de vitamina B12 em específico é considerada uma causa reversível de demência (Lauer *et al.*, 2022), estando associada a um aumento na produção de interleucina-6 e nos níveis do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (Evans *et al.*, 2017). Já foi evidenciado que a interleucina-6 é capaz de induzir a hiperfosforilação da proteína tau e a TNF- α favorece o acúmulo de beta-amilóide (β A) no cérebro, através da regulação positiva da β -secretase e aumento da atividade da γ -secretase, promovendo aumento na concentração de isoformas tóxicas da proteína β A (Lauer *et al.*, 2022). De acordo com alguns estudos, níveis elevados de homocisteína também podem ser considerados um marcador de deficiência de B12, que pode causar danos cerebrais por estresse oxidativo, aumentando o influxo de cálcio e a apoptose (Kinney *et al.*, 2018). A aferição de deficiência de B12 deve ser feita em caso de suspeita de DA, medindo-se o nível da vitamina no plasma, juntamente com hemograma completo e testes de níveis homocisteína no sangue (Cho *et al.*, 2018; Jatoi *et al.*, 2020). Considerando as consequências no organismo, alguns indivíduos com deficiência de vitamina B12 apresentam sintomas de demência similares a casos de DA. Entretanto, na maioria dos casos, após a normalização nos níveis da vitamina, os sintomas regridem (Lauer *et al.*, 2022).

Quadro 1: Critérios do NINCDS-ADRDA para classificação dos pacientes com DA provável, possível ou definitiva (continua)

Categorização da DA	Principais Características
Possível	Manifestação, apresentação ou curso clínico atípicos de demência Outra doença capaz de produzir demência está presente, mas não é considerada a causa primária
Provável	Demência estabelecida por critérios clínicos Demência confirmada por testes cognitivos Déficit em dois ou mais domínios da cognição Declínio progressivo da memória e em outras funções cognitivas Consciência preservada Manifestação entre 40 e 90 anos Ausência de outras doenças sistêmicas ou cerebrais que contribuam para os sintomas

Quadro 1: Critérios do NINCDS-ADRDA para classificação dos pacientes com DA provável, possível ou definitiva (conclusão)

Definitiva	Critérios Clínicos para DA provável Diagnóstico histopatológico por autópsia ou biópsia
------------	--

Fonte: McKhann e colaboradores (2011) com modificações.

Declínio Cognitivo Mínimo

O Declínio Cognitivo Mínimo (DCM) é considerado um estágio intermediário entre o envelhecimento normal e a demência (Petersen *et al.*, 2018). Este estágio pode progredir para a DA, sendo considerado um estágio prodromico da doença (Prestia *et al.*, 2013; Jongsiriyanyong & Limpawattana, 2018), com uma taxa anual de progressão de aproximadamente 5% a 17% (Ganguli *et al.*, 2013; Petersen *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016).

A prevalência de DCM em adultos acima de 60 anos é de cerca de 6% a 25%. O risco de desenvolvimento de DCM aumenta com a idade e é inversamente proporcional ao nível de escolaridade (Langa *et al.*, 2014, Cheng *et al.*, 2017) A prevalência do DCM é variável, devido às diferenças de diagnóstico de DCM utilizadas na maioria dos estudos. Enquanto a prevalência da DA é maior em mulheres, o DCM é mais prevalente em homens (Sohn *et al.*, 2017).

Os critérios atuais de diagnóstico para DCM incluem: observação de alteração na cognição, função cognitiva anormal em um ou mais domínios, atividades diárias normais e ausência de demência (Nelson *et al.*, 2008; Petersen *et al.*, 2018). Uma entrevista completa sobre o histórico do paciente com familiares ou pessoas próximas, a fim de detectar pistas do quadro clínico é fundamental para fazer o diagnóstico. Testes de triagem cognitiva como o Mini Exame do Estado Mental (MEEM) são outra parte crucial para o diagnóstico clínico de pacientes com DCM (Shim *et al.*, 2017). Anteriormente, o DCM era definido concentrando-se principalmente na perda de memória, mas depois passou-se a incluir na sua definição o comprometimento não amnésico de domínio único ou vários domínios cognitivos com ou sem déficit de memória (Petersen *et al.*, 2018).

Alguns biomarcadores já foram associados à progressão de DCM para DA. O mais importante é a presença do alelo $\epsilon 4$ no gene da Apolipoproteína E (*APOE*), de modo que indivíduos com um único alelo $\epsilon 4$ têm um risco duas vezes maior de progredir para a DA, enquanto que indivíduos com alelo $\epsilon 4$ em homozigose têm risco quatro vezes maior de progressão, em relação a indivíduos que não apresentam este alelo (Campbell *et al.*, 2013). Outras formas de avaliação da progressão de DCM para DA envolvem a utilização de:

tomografia por emissão de pósitrons (PET) com marcador de PAs, níveis anormais da proteína tau no fluido cerebrospinal (FCE), e PET positiva para deposição de tau nas estruturas do lobo temporal lateral (Li *et al.*, 2016; Cheng *et al.*, 2017).

Abordagens terapêuticas

As abordagens farmacológicas disponíveis tanto para a DA como para o DCM atualmente não são capazes de impedir a progressão da doença. Elas promovem apenas uma melhora temporária dos sintomas ao estimular o aumento de neurotransmissores. Recentemente, um novo fármaco chamado aducanumab foi aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos, gerando grande expectativa no manejo de pacientes com DA (Mullard, 2021). Esse fármaco seria utilizado para reduzir o acúmulo de proteína βA no cérebro e, dessa maneira, interferir no avanço da doença, ao invés de apenas tratar os sintomas. Entretanto, muitos cientistas afirmam que não há evidências suficientes até o momento para considerar esse fármaco como uma terapia eficaz. Terapias não farmacológicas podem ser aplicadas com o intuito de manter ou melhorar as funções cognitivas, habilidade de realizar as tarefas do dia-a-dia ou melhorar a qualidade de vida em geral. Além disso, também são utilizadas para reduzir sintomas comportamentais como a depressão, apatia, agitação, distúrbios do sono e agressividade. Exemplos dessas abordagens incluem a arteterapia, terapia baseada em atividade e treinamento de memória. Assim como nas terapias farmacológicas, as terapias não farmacológicas não evidenciaram alterações na progressão da doença (Cummings *et al.*, 2019). Diante do exposto, a elucidação dos mecanismos biológicos envolvidos tanto na DA, como na progressão do DCM para a DA, bem como dos fatores de risco, são imprescindíveis para o desenvolvimento de novas terapias eficazes.

Fatores de risco na Doença de Alzheimer

A DA é uma doença etiologicamente complexa, envolvendo múltiplos fatores de risco genéticos e ambientais, podendo se manifestar de forma precoce, em indivíduos com idade inferior a 60 anos, tendo em sua maioria relação com herança genética familiar, e de forma tardia, em indivíduos com idade superior a 60 anos (Dai *et al.*, 2017). Todavia, 99% dos casos de DA se manifestam de forma tardia e têm natureza multifatorial, envolvendo múltiplos fatores genéticos, epigenéticos e ambientais, cada qual com pequenos efeitos aditivos.

Fatores Genéticos

Os aspectos genéticos da DA diferem entre a forma familiar de início precoce e a de início tardio. Casos raros de DA familiar de início precoce são causados por variantes de alta penetrância em genes que codificam a proteína precursora amilóide (*APP*), presenilina 1 (*PSEN1*) e presenilina 2 (*PSEN2*).

A *APP*, codificada pelo gene *APP* presente no cromossomo 21, é uma proteína transmembrana do tipo I clivada por α -, β - e γ -secretases, gerando a proteína β A e outras proteínas. Trinta variantes patogênicas foram relatadas no gene *APP*, das quais 25 demonstraram relação com a DA, causando acúmulo de proteína β A em quantidades elevadas. Todas as variantes patogênicas envolvem o local de clivagem das secretases. Além disso, uma variante (p.Ala673Thr) protege contra a DA, reduzindo a secreção de proteína β A, β A40 e β A42 (Goate *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2019). Em estudos *in vivo* com camundongos, as variantes p.Lys670Met/ p.Asp671Leu demonstraram estar associadas a um aumento no nível de PAs no hipocampo e córtex, com ausência de ENFs. As variantes p.Ala673Val, p.Asp678His, p.Asp678Asn, p.Glu682Lys e p.Lys687Asn estão relacionadas à atrofia cortical, enquanto que a variante p.Glu682Lys se mostrou associada à atrofia hipocampal. Em estudos neuropatológicos para a variante p.Ala673Val foi observada a presença de ENFs, níveis elevados de proteína β A, ativação de microglia e astrócitos, e perda neuronal, em comparação com o restante das variantes mencionadas, que não foram associadas à alteração na proteína β A intracelular, de acordo com os dados neuropatológicos (Bi *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2019). Outras variantes, como p.Thr714Ile, p.Val715Ala, p.Val715Met, p.Val717Ile, p.Val717Leu, p.Leu723Pro, p.Lys724Asn e p.Ile716Val, afetam o sítio de clivagem da γ -secretase, provocando aumento nos níveis de β A40 e β A42, enquanto que a variante p.Glu693del é uma deleção que promove o aumento da formação de proteína β A neurotóxica (Dai *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2020).

Os genes *PSEN1* e *PSEN2* estão localizados nos cromossomos 14 e 1, respectivamente. Variantes no *PSEN1* são mais comuns, com mais de 200 variantes patogênicas já observadas, enquanto que no *PSEN2* foram observadas menos de 40 variantes patogênicas (Cai *et al.*, 2015; Lanoiselee *et al.*, 2017). A *PSEN1* é uma das proteínas que faz parte do complexo γ -secretase e desempenha uma função importante na produção da proteína β A a partir da *APP*. Variantes patogênicas no gene *PSEN1* aumentam a proporção de β A42/ β A40 ao mesmo tempo que diminuem os níveis de β A40. Em um estudo de inativação do *PSEN1* em camundongos foi

observado que as variantes p.Cys410Tyr e p.Leu435Phe aumentam a proporção de β A42/ β A40, devido a uma redução significativa dos níveis de β A40 (Kelleher *et al.*, 2017).

Em contraste, variantes no gene *PSEN2* são mais raras e desempenham um papel menor na produção da proteína β A. As variantes p.Asn141Ile, p.Thr122Pro, p.Met239Val e p.Met239Ile na *PSEN2* causam um aumento significativo na atividade do complexo γ -secretase com elevação dos níveis de β A42, enquanto outras variantes raras são consideradas benignas (Walker *et al.*, 2005; Cai *et al.*, 2015).

Dentre os fatores genéticos associados à forma tardia da DA, o alelo ϵ 4 do gene da apolipoproteína E (*APOE*) foi o que mais foi reproduzido em diferentes populações (Perkovic & Pivac, 2019). A proteína *APOE* é uma glicoproteína altamente expressa no fígado, em astrócitos e em algumas micróglia, atuando como um ligante de lipoproteínas como o colesterol, que é essencial para produção de mielina e para as funções cerebrais normais (Giau *et al.*, 2015). O gene *APOE*, localizado no cromossomo 19, gera três isoformas proteicas: ApoE2, ApoE3 e ApoE4, devido a variantes de nucleotídeo único (SNVs) em sua sequência codificante. O alelo ϵ 4 do gene *APOE* é considerado o maior fator de risco para o desenvolvimento da DA esporádica em diferentes populações, quando comparado aos alelos ϵ 2 e ϵ 3, que estão associados a um menor risco e efeito protetor, respectivamente (Kim *et al.*, 2009; Breijyeh *et al.*, 2020). O alelo ϵ 4 apresenta um papel importante em relação ao acúmulo de proteína β A, causando angiopatia amiloide cerebral, que é um marcador conhecido da DA (Husain *et al.*, 2021). Além disso, já foi observada associação do alelo ϵ 4 com risco maior de lesões vasculares, provocando uma patogênese semelhante à DA (Giau *et al.*, 2015).

Embora os fatores genéticos relacionados à forma tardia da DA não sejam totalmente claros, estudos com gêmeos monozigóticos mostraram que a herdabilidade na DA é de 60-80% (Gatz *et al.*, 2006), apontando para uma grande contribuição de fatores genéticos, muitos deles ainda não identificados ou não reproduzidos em diferentes populações. Nos últimos anos, o avanço metodológico e a utilização de coortes grandes de pacientes com DA têm possibilitado a identificação de um grande quantitativo de variantes genéticas envolvidas na natureza geneticamente complexa da DA de início tardio, através de sequenciamento massivo do DNA e de estudos de associação genômica ampla. Recentemente, um amplo estudo desta natureza identificou 75 *loci* envolvidos na DA. Análises de enriquecimento de caminhos biológicos para estes *loci* confirmaram o envolvimento de processos envolvendo as proteínas amiloide/tau e implicação da micróglia. Além disso, a priorização de genes nos novos *loci* identificou 31 genes

sugestivos de estarem envolvidos em novos processos geneticamente associados, incluindo o processo do fator de necrose tumoral alfa através do complexo de montagem de cadeia linear de ubiquitina (Bellenguez *et al.*, 2022).

Fatores Epigenéticos

O conhecimento sobre o envolvimento de fatores epigenéticos na DA é crescente, sendo a metilação e a desmetilação do DNA, os mecanismos mais estudados até o momento. Em um estudo com camundongos, os níveis e a distribuição de 5-metilcitosina (5-mC) e de 5-hidrometilcitosina (5-hmC) foram avaliados em várias regiões do cérebro durante o envelhecimento do grupo selvagem e do grupo triplo transgênico, um modelo para a DA (3xTG-AD). Uma redução global de 5-mC e um aumento de 5-hmC no cérebro de camundongos 3xTG-AD idosos foram observados, em comparação com o tipo selvagem (Cadena-del-Castillo *et al.*, 2014). Esses dados sugerem um estado anormal de uma cromatina mais permissiva, podendo levar a um aumento nas modificações epigenéticas associadas à DA (Tecalco-Cruz *et al.*, 2020).

In vitro, a diminuição dos níveis de metilação do DNA das células do hipocampo e do córtex cerebral também já foram observadas na DA. Neurônios corticais de cérebros *post mortem* com DA demonstraram níveis de 5-mC mais baixos do que nos de controles saudáveis. Da mesma forma, baixos níveis de 5-mC foram observados no hipocampo, córtex cerebral e cerebelo de pacientes com DA (Chouliaras *et al.*, 2013; Condliffe *et al.*, 2014). Além disso, alguns elementos de manutenção da metilação, como a DNAmetiltransferase 1 e a proteína ligadora de metil 2 encontraram-se em menores concentrações no hipocampo de cérebros de portadores de DA, em contraste com controles saudáveis (Mastroeni *et al.*, 2010; Tecalco-Cruz *et al.*, 2020). Curiosamente, no trabalho de Mastroeni e colaboradores (2010) realizado com gêmeos monozigóticos, níveis normais de 5-mC foram encontrados nos neurônios, micróglia, e astrócitos do gêmeo saudável, mas não no cérebro do gêmeo com DA, demonstrando uma redução na metilação do DNA em vários tipos de células no cérebro com DA (Mastroeni *et al.*, 2010).

Além da metilação/desmetilação do DNA, vários RNAs não codificantes estão envolvidos na diferenciação, conexões e funções dos neurônios, bem como em processos neurodegenerativos, participando de mecanismos de proteostase, disfunção mitocondrial, apoptose e redução do fator neurotrófico nos neurônios e células gliais (Wu *et al.*, 2020). Uma injeção intracerebroventricular de proteína β A 1-42 resultou em um padrão fenotípico de DA e

desregulação de RNAs não codificantes na região do hipocampo que incluíram microRNAs (miRNAs) e RNAs longos não codificantes (lncRNAs) (Wang *et al.*, 2018). Curiosamente, alguns miRNAs foram considerados biomarcadores sanguíneos para DA (Htike *et al.*, 2019). A expressão de vários miRNAs, tais como miRNA-29a, miRNA-29b e miRNA-29c, encontrou-se reduzida com um aumento na expressão de β -secretase 1 (BACE1), que é essencial para produção da proteína β A. Essa desregulação foi detectada no cérebro e no sangue periférico de pacientes com DA (Lei *et al.*, 2015, Yang *et al.*, 2015). Em contraste, níveis aumentados de miRNA-7, miRNA-9-1, miRNA-23a/miRNA-27a, miRNA-34a, miRNA-125b-1, miRNA-146a e miRNA-155 foram observados em amostras de neocórtex de DA *post mortem*, em comparação com amostras de controles saudáveis (Pogue *et al.*, 2018). Além disso, níveis aumentados de miRNA-135a e miRNA-384 e níveis diminuídos de miRNA-193b foram observados no sangue de pacientes com DA, em comparação com controles saudáveis (Yang *et al.*, 2018).

Fatores Ambientais

Envelhecimento

O envelhecimento é considerado por si só o fator de risco mais importante para a DA tardia. Ele consiste em um processo complexo e irreversível que envolve múltiplos órgãos e tecidos celulares, com redução de volume e massa encefálica, perda de sinapses e alargamento de ventrículos cerebrais em áreas específicas acompanhados de deposição de PAs e ENFs (Scheltens *et al.*, 2021). Além disso, diversas condições podem surgir durante o envelhecimento, como o hipometabolismo da glicose, a qual é de extrema relevância para o metabolismo cerebral, e sua alteração pode levar à disfunção da homeostase, disfunção mitocondrial, depressão e declínio cognitivo. Algumas dessas condições também se apresentam no processo de envelhecimento fisiológico natural, embora de forma mais branda, o que gera dificuldades no reconhecimento de casos de DA de início precoce (Riedel *et al.*, 2016; Hou *et al.*, 2019). Contudo, apenas o envelhecimento e os fatores genéticos não são suficientes para explicar todos os casos de DA. Fatores de risco ambientais, incluindo poluição atmosférica, dieta, metais pesados, infecções entre outros podem contribuir para o estresse oxidativo e inflamações, aumentando o risco de desenvolvimento da DA (Wainana *et al.*, 2014; Breijyeh *et al.*, 2020).

Poluição atmosférica

Poluentes químicos, físicos e biológicos presentes na atmosfera já foram associados com doenças cardiovasculares e respiratórias, e recentemente, sua relação com a DA foi evidenciada (Croze *et al.*, 2018). Seis poluentes foram definidos como ameaça para a saúde humana de acordo com os Padrões Nacionais de Qualidade do Ar Ambiente dos EUA (NAAQSs) e incluem o ozônio (O³), óxidos de nitrogênio (NO_x), monóxido de carbono (CO), material particulado (MP), dióxido de enxofre (SO₂) e o chumbo. Estudos com animais e modelos celulares demonstraram que a exposição a altos níveis de poluição atmosférica pode resultar em danos na mucosa olfatória, no bulbo e também na região do córtex frontal, similar ao observado em casos de DA (Moulton *et al.*, 2012). Em indivíduos expostos à poluição atmosférica, existe uma relação entre o estresse oxidativo, neuroinflamação e neurodegeneração, com a presença de proteína tau hiperfosforilada e PAs na região do córtex frontal. A poluição pode causar ainda um aumento na formação e acúmulo de β A42, com consequente declínio na função cognitiva (Croze *et al.*, 2018).

Metais

Os metais podem ser encontrados tanto na natureza quanto em organismos biológicos, sendo divididos em biometais, os quais possuem função biológica em organismos vivos (cobre, zinco, ferro, etc.), e metais tóxicos que não apresentam nenhuma função no organismo (alumínio e chumbo). No organismo, o alumínio se liga a transferrinas presentes no plasma e moléculas de citrato que podem mediar o transporte de alumínio até o cérebro. O alumínio se acumula no córtex, hipocampo e em áreas do cerebelo, nos quais interage com proteínas causando desnaturação, acúmulo e hiperfosforilação em proteínas como a tau, um dos marcos da DA (Colomina *et al.*, 2017). O chumbo compete pelo sitio ativo de biometais, como o cálcio e pode cruzar a barreira hematoencefálica (BHE) rapidamente, onde pode modificar a diferenciação neuronal e sinaptogênese, causando danos severos. A exposição aguda ao chumbo foi associada à DA, causando aumento na expressão da β -secretase e acúmulo de proteína β A. Além dele, o cádmio sendo um metal solúvel, também consegue atravessar a BHE e causar doenças neurológicas como a DA. Íons de Cádmio estão envolvidos no acúmulo das PAs e de proteínas tau hiperfosforiladas no cérebro (Huat *et al.*, 2019).

Infecções

Infecções crônicas no SNC podem provocar acúmulo de PAs e ENFs, sendo também consideradas fatores de risco para DA. Estudos evidenciaram a presença do DNA do vírus herpes simples tipo 1 (HSV-1) em pacientes com o alelo $\epsilon 4$ do *APOE*. O HSV-1 consegue se replicar no cérebro, podendo gerar uma resposta inflamatória e acúmulo de proteína βA , causando danos aos neurônios e desenvolvimento gradual da DA (Sochoka *et al.*, 2017). Além disso, também foi observado o impacto de infecções bacterianas crônicas em casos de DA como a demência sífilítica, causada pela bactéria *Treponema pallidum*, que se acumula no córtex cerebral, produzindo lesões similares àsquelas dos ENFs e gerando distúrbios neurodegenerativos graves. Infecções causadas por *Chlamydia pneumonia* também podem contribuir para o desenvolvimento da DA pela ativação de astrócitos e micróglias citotóxicas, gerando desregulação de cálcio e apoptose, além de declínio da função cognitiva (Fulop *et al.*, 2018; Muzambi *et al.*, 2019).

Dieta

Ao longo dos últimos anos, o número de estudos que associam a nutrição com a DA vem aumentando. Diversos suplementos alimentares como antioxidantes, vitaminas e polifenóis foram tidos como elementos importantes na redução do risco de desenvolvimento da DA. Por outro lado, ácidos graxos saturados e alto consumo calórico foram associados com aumento no risco de DA (Hu *et al.*, 2013, Fernández *et al.*, 2018). O processamento de alimentos causa degradação de micronutrientes sensíveis ao calor (Vitamina C e folato), perda de água e formação de produtos secundários tóxicos (produtos finais da glicação avançada, AGEs). O efeito tóxico das AGEs é resultado da sua capacidade de induzir o estresse oxidativo e inflamações, através de modificações na estrutura de proteínas receptoras da superfície celular (Abate *et al.*, 2017). Diferentes estudos associaram níveis elevados de AGEs no sangue com declínio cognitivo e progressão da DA. O receptor da AGE (RAGE) se encontra em diferentes locais no organismo, inclusive em astrócitos e micróglias, e sua super expressão foi observada no cérebro de indivíduos com DA, onde atua como transportador e receptor de superfície celular para proteína βA (Abate *et al.*, 2017). A deficiência em nutrientes como folato, vitamina B12 e vitamina D pode causar declínio na função cognitiva e o risco de desnutrição aumenta, considerando que pacientes com DA tem dificuldades na alimentação e deglutição (Koyama *et al.*, 2016).

Doenças Cardiovasculares

Doenças cardiovasculares são um importante fator de risco para o desenvolvimento da DA, como o acidente vascular encefálico (AVE), que apresenta forte associação com o risco de demência, devido à perda do tecido cerebral, aumentando o efeito neurodegenerativo e influenciando a formação das lesões histopatológicas características da DA. A fibrilação atrial também pode causar embolias que levam a ocorrência de AVEs, alterações na memória e declínios cognitivos (De Bruijn *et al.*, 2014). Foi evidenciado que doença arterial coronariana (DAC), aterosclerose, doença arterial periférica (DAP), hipoperfusão e embolia estão relacionadas com aumento do risco de desenvolvimento da DA. Além disso, a hipertensão está associada ao espessamento das paredes dos vasos sanguíneos e estreitamento do lúmen, reduzindo o fluxo de sangue no cérebro e, em casos crônicos, causando edema cerebral com alto risco de AVE e consequente aumento do risco de DA (Santos *et al.*, 2017).

Obesidade e diabetes

O aumento de gordura corporal está associado com menor fornecimento de sangue ao cérebro, podendo levar a casos de isquemia cerebral, perda de memória e demência vascular (Alford *et al.*, 2018). A obesidade, má alimentação e outros fatores podem causar alteração na tolerância à glicose (TG) ou diabetes, que é caracterizada por hiperglicemia afetando tecidos periféricos e vasos sanguíneos. A hiperglicemia crônica pode provocar declínio cognitivo através do acúmulo de β A, estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e neuroinflamação (Pegueroles *et al.*, 2018). A inflamação cerebral causa um aumento nas micróglias e resulta em uma redução na plasticidade sináptica e comprometimento da neurogênese. As micróglias podem afetar o substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1) e bloquear a sinalização intracelular de insulina. Essa alteração na ação da insulina pode resultar no acúmulo de β A e reduzir a degradação da proteína tau hiperfosforilada associada à DA (Anjum *et al.*, 2018, Lee *et al.*, 2018).

Microbiota

O eixo microbiota-intestino-cérebro forma um sistema de comunicação bidirecional que é conectado por vias neurais, imunológicas, endócrinas e metabólicas (Jiang *et al.*, 2017). Estudos recentes sugerem que a microbiota intestinal desempenha um papel fundamental na modulação das funções intestinais e cerebrais (Sharon *et al.*, 2016, Dinan *et al.*, 2017). Disbiose e alterações na composição da microbiota intestinal contribuem para o desenvolvimento e

progressão de muitas doenças humanas e evidências recentes também fazem associação entre essas alterações com o desenvolvimento da DA (Miyake *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2016).

Como o envelhecimento é o fator de risco predominante para DA, alterações relacionadas à idade podem desempenhar um papel potencial no desenvolvimento da doença. Foram observadas alterações na composição da microbiota intestinal em idosos, com uma diminuição de grupos de bactérias consideradas benéficas, como *Bacteroidetes*, *Lactobacillus* e *Bifidobacteria* (Woodmansey *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2017). No entanto, outro estudo mostrou que a razão *Firmicutes/Bacteroidetes* sofre um aumento de 0,4 na infância para 10,9 na idade adulta (25 a 45 anos) e uma diminuição para 0,6 em idosos (70 a 90 anos) (Mariat *et al.*, 2009). Mais recentemente, foi observado que um microbioma intestinal central, compreendendo espécies das famílias *Bacteroidaceae*, *Lachnospiraceae* e *Ruminococcaceae*, está presente no hospedeiro humano ao longo da vida, com redução na abundância relativa de forma cumulativa com avanço da idade. Em particular, *Coprococcus*, *Roseburia* e *Faecalibacterium* foram correlacionados negativamente com a idade. Em contraste, *Oscillospira* foi positivamente correlacionada com a idade, bem como dois membros subdominantes da ordem *Bacteroidales* (*Odoribacter* e *Butiricimonas*) (Biagi *et al.*, 2016). Embora esses achados não sejam consistentes, as alterações na composição da microbiota intestinal com diversidade reduzida de organismos são importantes e podem ser influenciadas por diferentes dietas, ambientes como hospitais, comunidades de reabilitação, asilos além de alterações causadas por utilização de antibióticos e probióticos (Perez Martinez *et al.*, 2014; Zapata *et al.*, 2015). O envelhecimento está associado a uma super estimulação de sistemas imunológicos inatos e adaptativos, resultando em estados de inflamação crônica de baixo grau que pode aumentar a permeabilidade intestinal e translocação de bactérias (Jiang *et al.*, 2017). Alguns grupos específicos de bactérias como *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* ou *Faecalibacterium* podem modular a inflamação em nível do epitélio intestinal. Foi evidenciado que altos níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-6,-8 (IL-6 e IL-8), em idosos centenários estavam correlacionados com um enriquecimento em *Proteobacteria* e uma diminuição em vários grupos de bactérias produtoras de butirato (Biagi *et al.*, 2010). Além disso, a abundância de *Bifidobacterium* na microbiota de idosos correlacionou-se negativamente com os níveis sanguíneos de TNF- α e IL-10. Consequentemente, a composição da microbiota pode modular o processo inflamatório. Somado a isto, durante o envelhecimento, a barreira hematoencefálica (BHE) é comprometida e isso pode influenciar não apenas na depuração de

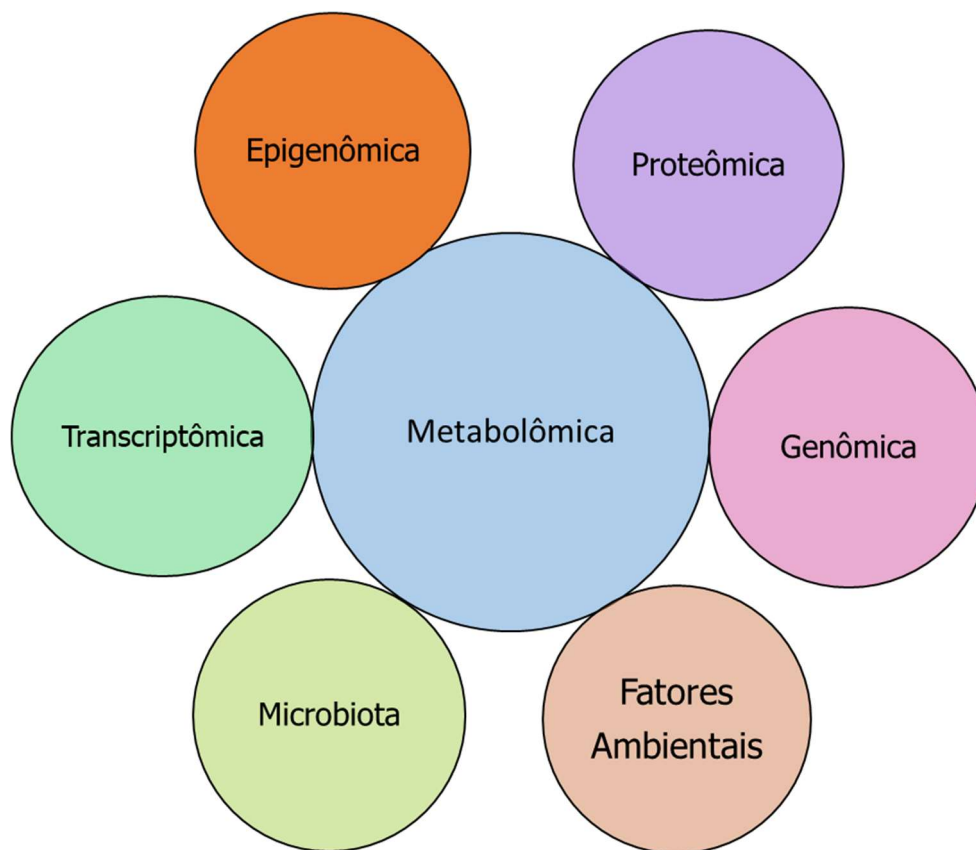
β A do cérebro, mas também todo o processo de sinalização envolvida na neuroinflamação que é observada na DA (Montagne *et al.*, 2015; Erdo *et al.*, 2016).

Metabolômica e Doença de Alzheimer

A metabolômica é um sistema relativamente recente de abordagens biológicas, através do qual múltiplas ferramentas são utilizadas para medir níveis de concentração de diversos metabólitos presentes em amostras biológicas. Metabólitos são pequenas moléculas (<1,500Da) envolvidas na maioria das funções biológicas (Markley *et al.*, 2017). Mudanças entre os perfis metabólicos podem refletir diferenças no *background* genético, modificações epigenéticas, aspectos transcriptômicos e proteômicos, dieta, estilo de vida, microbiota intestinal, estresse, exposição a patógenos, medicamentos, entre outros (Havelund *et al.*, 2017). Alguns estudos já associaram a ocorrência de metabólitos alterados em indivíduos com DA a algumas vias metabólicas como o metabolismo energético, atividade de neuromodulação e neuroproteção, metabolismo da metionina, modulação de proteínas e metabolismo de lipídeos (Zhang *et al.*, 2015, Newman & Verdin, 2017, Tasca *et al.*, 2018, Magistretti & Allaman, 2018, Robinson *et al.*, 2018). Portanto, a metabolômica tem grande importância para a elucidação de fatores etiológicos relacionados a doenças de natureza complexa, como é o caso da DA (**Figura 4**).

Uma vantagem da metabolômica é a capacidade de identificar alterações dinâmicas, quantitativas e qualitativas em uma grande quantidade de metabólitos, identificando alterações em múltiplas estruturas fisiológicas. Oliver e colaboradores (1998) foram os primeiros a utilizar o termo *metaboloma* para enfatizar a importância de medir alterações na concentração de metabólitos como consequência de alterações na expressão gênica. Inicialmente utilizada como instrumento para análises toxicológicas, a metabolômica vem crescendo em quantidade de estudos que associam distúrbios metabólicos ao desenvolvimento de diversas doenças. Em sistemas biológicos, existem mecanismos regulatórios variados em diferentes sistemas ômicos que podem alterar a produção e processamento de diversos metabólitos (Hampel *et al.*, 2021) As assinaturas metabólicas são individualmente únicas e alterações destas assinaturas podem sinalizar o desenvolvimento de doenças e seus mecanismos subjacentes (Wilkins *et al.*, 2018).

Figura 4: A metabolômica como cerne de outras ciências ÔMICAs



Fonte: o autor

A metabolômica abrange diversas abordagens analíticas, como a metabolômica dirigida, não dirigida, lipidômica e fluxômica (Charidemou *et al.*, 2017, Triebel *et al.*, 2017). A metabolômica não dirigida mensura centenas de metabólitos com o objetivo de identificar assinaturas metabólicas associadas a um estado doente ou a um fenótipo específico. Essa abordagem identifica alterações relativas nos metabólitos e é útil em projetos de investigação, nos quais não se tem conhecimento prévio de quais vias metabólicas estão afetadas. A metabolômica dirigida promove medidas quantitativas de um grupo específico de metabólitos em uma via de interesse (glicólise, ciclo do ácido tricarboxílico, etc). A lipidômica estima alterações em perfis lipídicos e requer protocolos especializados para detecção e análise de metabólitos insolúveis em água. A fluxômica incorpora traços de isótopos estáveis para promover uma avaliação dinâmica de alterações metabólicas feitas em células *in vivo*. Na maioria dos estudos, precursores do Carbono 13 (^{13}C) são introduzidos em um sistema e podem ser rastreados através de uma via metabólica pela medição de diferentes isotopômeros de massa, fornecendo maior entendimento do fluxo de uma rede metabólica específica. Essas abordagens

podem ser realizadas utilizando-se diversas amostras como células, tecidos e biofluidos (Wilkins & Trushina, 2018).

Estima-se que o metaboloma humano contenha aproximadamente 150 mil ou mais metabólitos (Markley *et al.*, 2017). Atualmente, o *Human Metabolome Database* (HMDB) contém mais de 100 mil registros de metabólitos (Wishard *et al.*, 2022). Embora uma boa parte dos metabólitos humanos ainda seja desconhecida, esforços significativos vêm sendo conduzidos para identificá-los. Devido à complexidade do metaboloma humano e à diversidade da composição de amostras, diversas plataformas analíticas vêm sendo utilizadas para detecção apropriada de cada grupo de metabólitos. A espectrometria de massa (EM) e a ressonância magnética nuclear (RMN) são as duas plataformas comumente utilizadas para detecção, quantificação e caracterização de metabólitos.

Espectrometria de Massa

A EM possui alta sensibilidade e capacidade de detecção ampla de metabólitos. A técnica de EM requer uma preparação de amostras mais elaborada. As amostras biológicas são separadas previamente à análise, utilizando-se para isto diversas técnicas de cromatografia. A cromatografia acoplada à EM possibilita uma análise multidimensional, fornecendo dados relacionados a estrutura química, massa, distribuição de isótopos e detecção de moléculas não identificadas (Reveglia *et al.*, 2021). A separação das amostras aumenta o tempo de análise envolvendo múltiplas corridas para um grande grupo amostral, o que gera variações entre os grupos de amostras, sendo um revés na aplicação dessa técnica. Além disso, embora apresente alta sensibilidade, aplicações paralelas das técnicas são necessárias para uma análise aprofundada do metaboloma (Wilkins & Trushina, 2018).

Ressonância Magnética Nuclear

A RMN é uma técnica quantitativa não destrutiva que fornece informações detalhadas de uma estrutura molecular. Embora tenha menor sensibilidade que a EM, a RMN oferece diversas vantagens (**Quadro2**) (Fan & Lane, 2016). A RMN permite a quantificação de diversos metabólitos presentes em células, tecidos e biofluidos sem a necessidade de uma preparação elaborada de amostras. Com essa técnica, é possível se identificar compostos com massas idênticas, mesmo os que apresentam distribuições de isotopômeros diferentes, sendo referência para identificação da estrutura de moléculas desconhecidas. Através da utilização de rótulos de isótopos estáveis, a RMN pode ser utilizada para elucidar a dinâmica e os

mecanismos das transformações metabólicas e explorar a compartimentalização de vias metabólicas. Além disso, tem vantagem quando se utiliza compostos difíceis de ionizar ou requerem derivatização para EM (Markley *et al.*, 2017).

Quadro 2: Características das duas principais plataformas analíticas utilizadas na metabolômica

Características	RMN	EM
Custo da plataforma	Alto	Moderado
Análises	Análise não dirigida Alta reprodutibilidade	Análise Dirigida Análise Não Dirigida Reprodutibilidade moderada
Preparação de amostras	Simples Possível utilizar diretamente o biofluido ou tecido Reutilização de amostra	Preparação elaborada Requer extração de metabólicos Cromatografia de gás é volátil e requer derivatização Cromatografia líquida pode formar adutos
Sensibilidade	Baixa amplitude (micromolar) Requer compostos protonados Detecta a maioria dos compostos orgânicos	Alta amplitude (Femtomolar) Detecta a maioria dos compostos orgânicos Detecta alguns compostos inorgânicos
Medições	Detecta todos os metabólitos em apenas uma corrida dentro da amplitude Grande quantidade de dados para análise	Requer múltiplas técnicas para análise aprofundada Maior amplitude para detecção de metabólitos

Fonte: Wilkins & Trushina (2018) com modificações

Os núcleos mais estudados em estudos biomoleculares com RMN são o ^1H (próton), ^{13}C , ^{15}N e ^{31}P . Destes, o ^1H é o mais sensível, seguido pelo ^{31}P . O ^{31}P é útil em estudos de energia celular *in vivo* e *ex vivo*, enquanto o ^1H RMN unidimensional (1D) é a abordagem mais utilizada em análises metabolômicas. Os sinais obtidos podem ser salvos e analisados ou inseridos em um padrão de sinais de metabólitos que se espera que estejam presentes na amostra. A RMN com ^{13}C obtém sinais que apresentam uma faixa de cobertura de 200 ppm comparado aos 10

ppm de ^1H , sendo melhor determinados, porém com menor sensibilidade. Os métodos bidimensionais (2D) de RMN oferecem melhor abordagem para identificação não ambígua de metabólitos em amostras. Esses métodos incluem a espectroscopia correlacionada (^1H - ^1H COSY), espectroscopia de correlação total (^1H - ^1H TOCSY) e correlação heteronuclear quântica simples (^1H - ^{13}C HSQC) (Markley *et al.*, 2017).

Distúrbios metabólicos são os primeiros sintomas detectados em pacientes diagnosticados com DCM (Pagani *et al.*, 2017). Essas evidências sugerem que o metabolismo desempenha um papel crucial nos mecanismos iniciais de desenvolvimento da DA. Dependendo do estágio da DA e de variações individuais (idade, sexo, etnia, etc.), as opções terapêuticas podem variar e provavelmente serão feitas de forma complementar (Toledo *et al.*, 2017). Sendo assim, novas tecnologias vêm sendo implementadas para análises de alterações metabólicas associadas com estágios iniciais de doenças e podem agir como um instrumento para se identificar biomarcadores que sirvam como ferramentas de diagnóstico precoce.

A disponibilidade de biorepositórios como o *Coriell Cell Repository* e *Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative* (ADNI), que contém amostras de biofluidos e tecidos celulares de controles saudáveis e pacientes com DA, tem propiciado uma oportunidade para o avanço na compreensão de mecanismos e alterações metabólicas associadas à doença ou a alterações individuais (sexo, idade, etnia, etc.). Sendo assim, estudos com abordagem metabolômica poderiam aumentar a eficiência da medicina especializada. Além disso, como grande parte das vias metabólicas são bem conservadas entre as espécies, a aplicação de análises metabolômicas pode servir como uma ótima ferramenta para transpor resultados experimentais obtidos em modelos animais para humanos (Hampel *et al.*, 2021).

Em pacientes com DCM, alterações metabólicas precoces foram associadas com uma redução na utilização de glicose no cérebro (Mosconi *et al.*, 2008, Mosconi *et al.*, 2013). Esse hipometabolismo cerebral ocorre cerca de 20 anos antes da manifestação dos sintomas clínicos, sugerindo que distúrbios metabólicos são um fator contributivo no desenvolvimento da DA (Burke *et al.*, 2016, Jack *et al.*, 2018). Quando as funções glicolíticas do cérebro são perturbadas, mecanismos compensatórios utilizam fontes energéticas alternativas para manter a homeostase. Um estudo utilizando modelos animais associou a degeneração de tecidos cerebrais com a ocorrência de catabolismo de lipídeos que compensava a redução de utilização da glicose (Klosinski *et al.*, 2015). Em análises de plasma e de líquido, assinaturas metabólicas únicas foram associadas com alterações na homeostase energética em pacientes com DCM, que se

tornavam mais acentuadas em pacientes com DA (Trushina *et al.*, 2013, Wilkins *et al.*, 2018). Em pacientes com DCM, alterações de estruturas metabólicas foram observadas em comparação com indivíduos saudáveis, incluindo o metabolismo da lisina, ciclo do ácido tricarboxílico (ATC), metabolismo lipídico e corpos cetônicos mitocondriais. Em pacientes com DA, alterações metabólicas em diversas estruturas relacionadas à neurotransmissão e à inflamação foram detectadas em análises de plasma e liquor, além das alterações na homeostase energética que se mantiveram acentuadas (Trushina *et al.*, 2013).

A evidência crescente de alterações nas estruturas metabólicas em pacientes com DCM e DA oferece uma oportunidade de maior compreensão dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da doença, além de possibilitar a identificação de biomarcadores que sirvam para um diagnóstico precoce ou de possíveis alvos terapêuticos (Godyn *et al.*, 2016). Considerando os diversos fatores (genéticos e não genéticos) que podem contribuir para o risco de desenvolvimento do DCM e da DA, a caracterização de perfis metabólicos nestas condições em nossa população é de grande importância. No Brasil, dados de metabolômica de indivíduos com DA são ainda escassos e para indivíduos com DCM essa carência é ainda mais significativa, devido à dificuldade de obtenção de amostras desse grupo, já que a maioria dos pacientes só procura ajuda médica quando o quadro demencial já está instalado. Levando-se em conta a alta diversidade étnica da população do Rio de Janeiro, a identificação de biomarcadores metabólicos circulantes em nossa população, utilizando amostras não invasivas pode trazer dados ainda desconhecidos.

REFERÊNCIAS

Albert MS, DeKosky ST, Dickson D, Dubois B, Feldman HH, Fox NC, Gamst A, Holtzman DM, Jagust WJ, Petersen RC, Snyder PJ, Carrillo MC, Thies B, Phelps CH. The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2011 May;7(3):270-9. doi: 10.1016/j.jalz.2011.03.008. Epub 2011 Apr 21. PMID: 21514249; PMCID: PMC3312027.

Alzheimer Association. Alz.org FDA-approved treatments for Alzheimer's. Disponível em: <https://www.alz.org/media/documents/fda-approved-treatments-alzheimers-ts.pdf>. Acesso em: 03 de Ago. de 2022.

Appleby BS, Cummings JL. Discovering new treatments for Alzheimer's disease by repurposing approved medications. *Curr Top Med Chem*. 2013;13(18):2306-27. doi: 10.2174/15680266113136660162. PMID: 24059463.

Arun P, Ariyannur PS, Moffett JR, Xing G, Hamilton K, Grunberg NE, Ives JA, Namboodiri AM. Metabolic acetate therapy for the treatment of traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2010 Jan;27(1):293-8. doi: 10.1089/neu.2009.0994. PMID: 19803785; PMCID: PMC2824219.

Atamna H, Frey WH 2nd. Mechanisms of mitochondrial dysfunction and energy deficiency in Alzheimer's disease. *Mitochondrion*. 2007 Sep;7(5):297-310. doi: 10.1016/j.mito.2007.06.001. Epub 2007 Jun 13. PMID: 17625988.

Bellenguez C, Küçükali F, Jansen IE, Kleindan L, Moreno-Grau S, Amin N, Naj AC, Campos-Martin R, Grenier-Boley B, Andrade V, Holmans PA, Boland A, Damotte V, van der Lee SJ, Costa MR, Kuulasmaa T, Yang Q, de Rojas I, Bis JC, Yaqub A, Prokic I, Chapuis J, Ahmad S, Giedraitis V, Aarsland D, Garcia-Gonzalez P, Abdelnour C, Alarcón-Martín E, Alcolea D, Alegret M, Alvarez I, Álvarez V, Armstrong NJ, Tsolaki A, Antúnez C, Appollonio I, Arcaro M, Archetti S, Pastor AA, Arosio B, Athanasiu L, Bailly H, Banaj N, Baquero M, Barral S, Beiser A, Pastor AB, Below JE, Benček P, Benussi L, Berr C, Besse C, Bessi V, Binetti G, Bizarro A, Blesa R, Boada M, Boerwinkle E, Borroni B, Boschi S, Bossù P, Bråthen G, Bressler J, Bresner C, Brodaty H, Brookes KJ, Brusco LI, Buiza-Rueda D, Bürger K, Burholt V, Bush WS, Calero M, Cantwell LB, Chene G, Chung J, Cuccaro ML, Carracedo Á, Cecchetti R, Cervera-Carles L, Charbonnier C, Chen HH, Chillotti C, Ciccone S, Claassen JAHR, Clark C, Conti E, Corma-Gómez A, Costantini E, Custodero C, Daian D, Dalmaso MC, Daniele A, Dardiotis E, Dartigues JF, de Deyn PP, de Paiva Lopes K, de Witte LD, Debette S, Deckert J,

Del Ser T, Denning N, DeStefano A, Dichgans M, Diehl-Schmid J, Diez-Fairen M, Rossi PD, Djurovic S, Duron E, Düzel E, Dufouil C, Eiriksdottir G, Engelborghs S, Escott-Price V, Espinosa A, Ewers M, Faber KM, Fabrizio T, Nielsen SF, Fardo DW, Farotti L, Fenoglio C, Fernández-Fuertes M, Ferrari R, Ferreira CB, Ferri E, Fin B, Fischer P, Fladby T, Fließbach K, Fongang B, Fornage M, Fortea J, Foroud TM, Fostinelli S, Fox NC, Franco-Macías E, Bullido MJ, Frank-García A, Froelich L, Fulton-Howard B, Galimberti D, García-Alberca JM, García-González P, Garcia-Madrona S, Garcia-Ribas G, Ghidoni R, Giegling I, Giorgio G, Goate AM, Goldhardt O, Gomez-Fonseca D, González-Pérez A, Graff C, Grande G, Green E, Grimmer T, Grünblatt E, Grunin M, Gudnason V, Guetta-Baranes T, Haapasalo A, Hadjigeorgiou G, Haines JL, Hamilton-Nelson KL, Hampel H, Hanon O, Hardy J, Hartmann AM, Hausner L, Harwood J, Heilmann-Heimbach S, Helisalmi S, Heneka MT, Hernández I, Herrmann MJ, Hoffmann P, Holmes C, Holstege H, Vilas RH, Hulsman M, Humphrey J, Biessels GJ, Jian X, Johansson C, Jun GR, Kastumata Y, Kauwe J, Kehoe PG, Kilander L, Ståhlbom AK, Kivipelto M, Koivisto A, Kornhuber J, Kosmidis MH, Kukull WA, Kuksa PP, Kunkle BW, Kuzma AB, Lage C, Laukka EJ, Launer L, Lauria A, Lee CY, Lehtisalo J, Lerch O, Lleó A, Longstreth W Jr, Lopez O, de Munain AL, Love S, Löwemark M, Luckcuck L, Lunetta KL, Ma Y, Macías J, MacLeod CA, Maier W, Mangialasche F, Spallazzi M, Marquié M, Marshall R, Martin ER, Montes AM, Rodríguez CM, Masullo C, Mayeux R, Mead S, Mecocci P, Medina M, Meggy A, Mehrabian S, Mendoza S, Menéndez-González M, Mir P, Moebus S, Mol M, Molina-Porcel L, Montreal L, Morelli L, Moreno F, Morgan K, Mosley T, Nöthen MM, Muchnik C, Mukherjee S, Nacmias B, Ngandu T, Nicolas G, Nordestgaard BG, Olaso R, Orellana A, Orsini M, Ortega G, Padovani A, Paolo C, Papenberg G, Parnetti L, Pasquier F, Pastor P, Peloso G, Pérez-Cordón A, Pérez-Tur J, Pericard P, Peters O, Pijnenburg YAL, Pineda JA, Piñol-Ripoll G, Pisanu C, Polak T, Popp J, Posthuma D, Priller J, Puerta R, Quenez O, Quintela I, Thomassen JQ, Rábano A, Rainero I, Rajabli F, Ramakers I, Real LM, Reinders MJT, Reitz C, Reyes-Dumeyer D, Ridge P, Riedel-Heller S, Riederer P, Roberto N, Rodriguez-Rodriguez E, Rongve A, Allende IR, Rosende-Roca M, Royo JL, Rubino E, Rujescu D, Sáez ME, Sakka P, Saltvedt I, Sanabria Á, Sánchez-Arjona MB, Sanchez-Garcia F, Juan PS, Sánchez-Valle R, Sando SB, Sarnowski C, Satizabal CL, Scamosci M, Scarmeas N, Scarpini E, Scheltens P, Scherbaum N, Scherer M, Schmid M, Schneider A, Schott JM, Selbæk G, Seripa D, Serrano M, Sha J, Shadrin AA, Skrobot O, Slifer S, Snijders GJL, Soininen H, Solfrizzi V, Solomon A, Song Y, Sorbi S, Sotolongo-Grau O, Spalletta G, Spottke A, Squassina A, Stordal E, Tartan JP, Tárraga L, Tesí N, Thalamuthu A, Thomas T, Tosto G, Traykov L, Tremolizzo L, Tybjærg-Hansen A,

Uitterlinden A, Ullgren A, Ulstein I, Valero S, Valladares O, Broeckhoven CV, Vance J, Vardarajan BN, van der Lugt A, Dongen JV, van Rooij J, van Swieten J, Vandenberghe R, Verhey F, Vidal JS, Vogelgsang J, Vyhnaek M, Wagner M, Wallon D, Wang LS, Wang R, Weinhold L, Wiltfang J, Windle G, Woods B, Yannakoulia M, Zare H, Zhao Y, Zhang X, Zhu C, Zulaica M; EADB; GR@ACE; DEGESCO; EADI; GERAD; Demgene; FinnGen; ADGC; CHARGE, Farrer LA, Psaty BM, Ghanbari M, Raj T, Sachdev P, Mather K, Jessen F, Ikram MA, de Mendonça A, Hort J, Tsolaki M, Pericak-Vance MA, Amouyel P, Williams J, Frikke-Schmidt R, Clarimon J, Deleuze JF, Rossi G, Seshadri S, Andreassen OA, Ingelsson M, Hiltunen M, Sleegers K, Schellenberg GD, van Duijn CM, Sims R, van der Flier WM, Ruiz A, Ramirez A, Lambert JC. New insights into the genetic etiology of Alzheimer's disease and related dementias. *Nat Genet.* 2022 Apr;54(4):412-436. doi: 10.1038/s41588-022-01024-z. Epub 2022 Apr 4. PMID: 35379992; PMCID: PMC9005347.

Bouatra S, Aziat F, Mandal R, Guo AC, Wilson MR, et al. (2013) The Human Urine Metabolome. *PLoS ONE* 8(9): e73076. doi:10.1371/journal.pone.0073076

Breijyeh Z, Karaman R. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules.* 2020 Dec 8;25(24):5789. doi: 10.3390/molecules25245789. PMID: 33302541; PMCID: PMC7764106.

Broom GM, Shaw IC, Rucklidge JJ. The ketogenic diet as a potential treatment and prevention strategy for Alzheimer's disease. *Nutrition.* 2019 Apr;60:118-121. doi: 10.1016/j.nut.2018.10.003. Epub 2018 Oct 10. PMID: 30554068.

Chibnik LB, White CC, Mukherjee S, Raj T, Yu L, Larson EB, Montine TJ, Keene CD, Sonnen J, Schneider JA, Crane PK, Shulman JM, Bennett DA, De Jager PL. Susceptibility to neurofibrillary tangles: role of the PTPRD locus and limited pleiotropy with other neuropathologies. *Mol Psychiatry.* 2018 Jun;23(6):1521-1529. doi: 10.1038/mp.2017.20. Epub 2017 Mar 21. PMID: 28322283; PMCID: PMC5608624.

Cunnane S, Nugent S, Roy M, Courchesne-Loyer A, Croteau E, Tremblay S, Castellano A, Pifferi F, Bocti C, Paquet N, Begdouri H, Bentourkia M, Turcotte E, Allard M, Barberger-Gateau P, Fulop T, Rapoport SI. Brain fuel metabolism, aging, and Alzheimer's disease. *Nutrition.* 2011 Jan;27(1):3-20. doi: 10.1016/j.nut.2010.07.021. Epub 2010 Oct 29. PMID: 21035308; PMCID: PMC3478067.

DeTure, M.A., Dickson, D.W. The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegeneration* 14, 32 (2019). <https://doi.org/10.1186/s13024-019-0333-5>

Dietschy JM. Central nervous system: cholesterol turnover, brain development and neurodegeneration. *Biol Chem*. 2009 Apr;390(4):287-93. doi: 10.1515/BC.2009.035. PMID: 19166320; PMCID: PMC3066069.

Forni S, Fu X, Palmer SE, Sweetman L. Rapid determination of C4-acylcarnitine and C5-acylcarnitine isomers in plasma and dried blood spots by UPLC-MS/MS as a second tier test following flow-injection MS/MS acylcarnitine profile analysis. *Mol Genet Metab*. 2010 Sep;101(1):25-32. doi: 10.1016/j.ymgme.2010.05.012. Epub 2010 Jun 10. PMID: 20591710.

Frota, N. A. F. et al. Critérios para o diagnóstico de Doença de Alzheimer. *Dement Neuropsychol.*, v. 5, supl. 1, p. 5-10, 2011.

Fuzikawa, C.; Uchoa, E.; Lima-Costa, M. F. Teste do relógio: uma revisão da literatura sobre este teste para rastreamento de déficit cognitivo. *J Bras Psiquiatr*, v. 52, n. 3, p. 223-235, 2003.

González-Domínguez R, Rupérez FJ, García-Barrera T, Barbas C, Gómez-Ariza JL. Metabolomic-Driven Elucidation of Serum Disturbances Associated with Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment. *Curr Alzheimer Res*. 2016;13(6):641-53. doi: 10.2174/1567205013666160129095138. PMID: 26825096.

Gray LR, Tompkins SC, Taylor EB. Regulation of pyruvate metabolism and human disease. *Cell Mol Life Sci*. 2014 Jul;71(14):2577-604. doi: 10.1007/s00018-013-1539-2. Epub 2013 Dec 21. PMID: 24363178; PMCID: PMC4059968.

Griffith HR, den Hollander JA, Stewart CC, Evanochko WT, Buchthal SD, Harrell LE, Zamrini EY, Brockington JC, Marson DC. Elevated brain scyllo-inositol concentrations in patients with Alzheimer's disease. *NMR Biomed*. 2007 Dec;20(8):709-16. doi: 10.1002/nbm.1132. PMID: 17295394.

Gu L, Guo Z. Alzheimer's A β 42 and A β 40 peptides form interlaced amyloid fibrils. *J Neurochem*. 2013 Aug;126(3):305-11. doi: 10.1111/jnc.12202. Epub 2013 Mar 12. PMID: 23406382; PMCID: PMC3716832.

GWAS catalog - https://www.ebi.ac.uk/gwas/efotraits/MONDO_0004975 - acesso em julho de 2022.

Hansson, O., Lehmann, S., Otto, M. *et al*. Advantages and disadvantages of the use of the CSF Amyloid β (A β) 42/40 ratio in the diagnosis of Alzheimer's Disease. *Alz Res Therapy* 11, 34 (2019). <https://doi.org/10.1186/s13195-019-0485-0>

Harald Hampel, Robert Nisticò, Nicholas T. Seyfried, Allan I. Levey, Erica Modeste, Pablo Lemerrier, Filippo Baldacci, Nicola Toschi, Francesco Garaci, George Perry, Enzo Emanuele, Pedro L. Valenzuela, Alejandro Lucia, Andrea Urbani, Giulia M. Sancesario, Mark Mapstone, Massimo Corbo, Andrea Vergallo, Simone Lista, Omics sciences for systems biology in Alzheimer's disease: State-of-the-art of the evidence, *Ageing Research Reviews*, Volume 69, 2021, 101346, ISSN 1568-1637, <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101346>.

Havelund, J.F.; Heegaard, N.H.H.; Færgeman, N.J.K.; Gramsbergen, J.B. Biomarker Research in Parkinson's Disease Using Metabolite Profiling. *Metabolites* **2017**, *7*, 42. <https://doi.org/10.3390/metabo7030042>

Holmes E, Foxall PJ, Spraul M, Farrant RD, Nicholson JK, Lindon JC. 750 MHz 1H NMR spectroscopy characterisation of the complex metabolic pattern of urine from patients with inborn errors of metabolism: 2-hydroxyglutaric aciduria and maple syrup urine disease. *J Pharm Biomed Anal.* 1997 Jul;15(11):1647-59. doi: 10.1016/s0731-7085(97)00066-6. PMID: 9260660.

HORT, J. et al. EFNS guidelines for the diagnosis and management of Alzheimer's Disease. *Eur J Neurol*, v. 17, n. 10, p. 1236-1248, 2010.

Jain, A., Li, X.H. & Chen, W.N. An untargeted fecal and urine metabolomics analysis of the interplay between the gut microbiome, diet and human metabolism in Indian and Chinese adults. *Sci Rep* 9, 9191 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45640-y>

Jeter CB, Hergenroeder GW, Ward NH 3rd, Moore AN, Dash PK. Human mild traumatic brain injury decreases circulating branched-chain amino acids and their metabolite levels. *J Neurotrauma.* 2013 Apr 15;30(8):671-9. doi: 10.1089/neu.2012.2491. Epub 2013 Apr 6. PMID: 23560894.

Jiang C, Li G, Huang P, Liu Z, Zhao B. The Gut Microbiota and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2017;58(1):1-15. doi: 10.3233/JAD-161141. PMID: 28372330.

Jongsiriyanyong S, Limpawattana P. Mild Cognitive Impairment in Clinical Practice: A Review Article. *Am J Alzheimers Dis Other Dement.* 2018 Dec;33(8):500-507. doi: 10.1177/1533317518791401. Epub 2018 Aug 1. PMID: 30068225.

Kristine Chobanyan, Anja Mitschke, Frank-Mathias Gutzki, Dirk O. Stichtenoth, Dimitrios Tsikas, Accurate quantification of dimethylamine (DMA) in human plasma and serum by GC–MS and GC–tandem MS as pentafluorobenzamide derivative in the positive-ion chemical

ionization mode, *Journal of Chromatography B*, Volume 851, Issues 1–2, 2007, Pages 240–249, ISSN 1570-0232, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.03.006>.

Lauer, A.A.; Grimm, H.S.; Apel, B.; Golobrodska, N.; Kruse, L.; Ratanski, E.; Schulten, N.; Schwarze, L.; Slawik, T.; Sperlich, S.; et al. Mechanistic Link between Vitamin B12 and Alzheimer's Disease. *Biomolecules* 2022, 12, 129. <https://doi.org/10.3390/biom12010129>.

Lauterburg BH, Grattagliano I, Gmür R, Stalder M, Hildebrand P. Noninvasive assessment of the effect of xenobiotics on mitochondrial function in human beings: studies with acetylsalicylic acid and ethanol with the use of the carbon 13-labeled ketoisocaproate breath test. *J Lab Clin Med*. 1995 Mar;125(3):378–83. PMID: 7897304.

Leng F, Edison P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? *Nat Rev Neurol*. 2021 Mar;17(3):157–172. doi: 10.1038/s41582-020-00435-y. Epub 2020 Dec 14. PMID: 33318676.

Liguori C, Stefani A, Sancesario G, Sancesario GM, Marciani MG, Pierantozzi M. CSF lactate levels, τ proteins, cognitive decline: a dynamic relationship in Alzheimer's disease. *J NeurolNeurosurg Psychiatry*. 2015 Jun;86(6):655–9. doi: 10.1136/jnnp-2014-308577. Epub 2014 Aug 13. PMID: 25121572.

Line Agledal, Marc Niere & Mathias Ziegler (2010) The phosphate makes a difference: cellular functions of NADP, *Redox Report*, 15:1, 2–10, DOI:10.1179/174329210X12650506623122

Lindberg, M.F.; Meijer, L. Dual-Specificity, Tyrosine Phosphorylation-Regulated Kinases (DYRKs) and cdc2-Like Kinases (CLKs) in Human Disease, an Overview. *Int. J. Mol. Sci*. 2021, 22, 6047. <https://doi.org/10.3390/ijms22116047>

Li NM, Liu KF, Qiu YJ, Zhang HH, Nakanishi H, Qing H. Mutations of beta-amyloid precursor protein alter the consequence of Alzheimer's disease pathogenesis. *Neural Regen Res*. 2019 Apr;14(4):658–665. doi: 10.4103/1673-5374.247469. PMID: 30632506; PMCID: PMC6352587.

Liu J, Li H, Gong T, Chen W, Mao S, Kong Y, Yu J, Sun J. Anti-neuroinflammatory Effect of Short-Chain Fatty Acid Acetate against Alzheimer's Disease via Upregulating GPR41 and Inhibiting ERK/JNK/NF- κ B. *J Agric Food Chem*. 2020 Jul 8;68(27):7152–7161. doi: 10.1021/acs.jafc.0c02807. Epub 2020 Jun 25. PMID: 32583667.

- Lodeiro M, Ibáñez C, Cifuentes A, Simó C, Cedazo-Mínguez Á. Decreased cerebrospinal fluid levels of L-carnitine in non-apolipoprotein E4 carriers at early stages of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2014;41(1):223-32. doi: 10.3233/JAD-132063. PMID: 24595197.
- López-Gamero AJ, Sanjuan C, Serrano-Castro PJ, Suárez J, Rodríguez de Fonseca F. The Biomedical Uses of Inositols: A Nutraceutical Approach to Metabolic Dysfunction in Aging and Neurodegenerative Diseases. *Biomedicines.* 2020 Aug 20;8(9):295. doi: 10.3390/biomedicines8090295. PMID: 32825356; PMCID: PMC7554709.
- Magistretti PJ, Allaman I. Lactate in the brain: from metabolic end-product to signalling molecule. *Nat Rev Neurosci.* 2018 Apr;19(4):235-249. doi: 10.1038/nrn.2018.19. Epub 2018 Mar 8. PMID: 29515192.
- Malloy-Diniz, L. F. *et al.* The Rey auditory-verbal learning test: applicability for the Brazilian elderly population. *Braz J Psychiatry*, v. 29, n. 4, p. 324-329, 2007.
- McLaurin J, Golomb R, Jurewicz A, Antel JP, Fraser PE. Inositol stereoisomers stabilize an oligomeric aggregate of Alzheimer amyloid beta peptide and inhibit abeta -induced toxicity. *J Biol Chem.* 2000 Jun 16;275(24):18495-502. doi: 10.1074/jbc.M906994199. PMID: 10764800.
- Mahdi JG, Mahdi AJ, Mahdi AJ, Bowen ID. The historical analysis of aspirin discovery, its relation to the willow tree and antiproliferative and anticancer potential. *Cell Prolif.* 2006 Apr;39(2):147-55. doi: 10.1111/j.1365-2184.2006.00377.x. PMID: 16542349; PMCID: PMC6496865.
- Makarova E, Makrecka-Kuka M, Vilks K, Volska K, Sevostjanovs E, Grinberga S, Zarkova-Malkova O, Dambrova M, Liepinsh E. Decreases in Circulating Concentrations of Long-Chain Acylcarnitines and Free Fatty Acids During the Glucose Tolerance Test Represent Tissue-Specific Insulin Sensitivity. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019 Dec 17;10:870. doi: 10.3389/fendo.2019.00870. PMID: 31920980; PMCID: PMC6927987.
- Markley JL, Brüschweiler R, Edison AS, Eghbalnia HR, Powers R, Raftery D, Wishart DS. The future of NMR-based metabolomics. *Curr Opin Biotechnol.* 2017 Feb;43:34-40. doi: 10.1016/j.copbio.2016.08.001. Epub 2016 Aug 28. PMID: 27580257; PMCID: PMC5305426.
- Mastroeni D, Grover A, Delvaux E, Whiteside C, Coleman PD, Rogers J. Epigenetic changes in Alzheimer's disease: decrements in DNA methylation. *Neurobiol Aging.* 2010 Dec;31(12):2025-37. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2008.12.005. Epub 2008 Dec 30. PMID: 19117641; PMCID: PMC2962691.

Meyer TW, Hostetter TH. Uremic solutes from colon microbes. *Kidney Int.* 2012 May;81(10):949-954. doi: 10.1038/ki.2011.504. Epub 2012 Feb 8. PMID: 22318422.

Michon C, Kang CM, Karpenko S, Tanaka K, Ishikawa S, Yoshida KI. A bacterial cell factory converting glucose into scyllo-inositol, a therapeutic agent for Alzheimer's disease. *Commun Biol.* 2020 Mar 2;3(1):93. doi: 10.1038/s42003-020-0814-7. PMID: 32123276; PMCID: PMC7052218.

Mierziak J, Burgberger M, Wojtasik W. 3-Hydroxybutyrate as a Metabolite and a Signal Molecule Regulating Processes of Living Organisms. *Biomolecules.* 2021 Mar 9;11(3):402. doi: 10.3390/biom11030402. PMID: 33803253; PMCID: PMC8000602.

Møller N. Ketone Body, 3-Hydroxybutyrate: Minor Metabolite - Major Medical Manifestations. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020 Sep 1;105(9): dgaa 370. doi: 10.1210/clinem/dgaa370. PMID: 32525972.

Moulton PV, Yang W. Air pollution, oxidative stress, and Alzheimer's disease. *J Environ Public Health.* 2012;2012:472751. doi: 10.1155/2012/472751. Epub 2012 Mar 15. PMID: 22523504; PMCID: PMC3317180.

Mullard Asher. Nature: More Alzheimer's drugs head for FDA review: what scientists are watching. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/d41586-021-03410-9>. Acesso em: 03 de Ago. de 2022.

Nemet I, Saha PP, Gupta N, Zhu W, Romano KA, Skye SM, Cajka T, Mohan ML, Li L, Wu Y, Funabashi M, Ramer-Tait AE, Naga Prasad SV, Fiehn O, Rey FE, Tang WHW, Fischbach MA, DiDonato JA, Hazen SL. A Cardiovascular Disease-Linked Gut Microbial Metabolite Acts via Adrenergic Receptors. *Cell.* 2020 Mar 5;180(5):862-877.e22. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.016. PMID: 32142679; PMCID: PMC7402401.

Newman JC, Verdin E. β -Hydroxybutyrate: A Signaling Metabolite. *Annu Rev Nutr.* 2017 Aug 21;37:51-76. doi: 10.1146/annurev-nutr-071816-064916. PMID: 28826372; PMCID: PMC6640868.

Pan H, Huang X, Li F, Ren M, Zhang J, Xu M, Wu M. Association among plasma lactate, systemic inflammation, and mild cognitive impairment: a community-based study. *Neurol Sci.* 2019 Aug;40(8):1667-1673. doi: 10.1007/s10072-019-03900-9. Epub 2019 Apr 27. PMID: 31030370.

Pan, J.W., Telang, F.W., Lee, J.H., De Graaf, R.A., Rothman, D.L., Stein, D.T. and Hetherington, H.P. (2001), Measurement of β -hydroxybutyrate in acute hyperketonemia in human brain. *Journal of Neurochemistry*, 79: 539-544. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00575.x>

Parikh S, Goldstein A, Koenig MK, Scaglia F, Enns GM, Saneto R, Anselm I, Cohen BH, Falk MJ, Greene C, Gropman AL, Haas R, Hirano M, Morgan P, Sims K, Tarnopolsky M, Van Hove JL, Wolfe L, DiMauro S. Diagnosis and management of mitochondrial disease: a consensus statement from the Mitochondrial Medicine Society. *Genet Med*. 2015 Sep;17(9):689-701. doi: 10.1038/gim.2014.177. Epub 2014 Dec 11. PMID: 25503498; PMCID: PMC5000852.

Parnetti L, Gaiti A, Polidori MC, Brunetti M, Palumbo B, Chionne F, Cadini D, Cecchetti R, Senin U. Increased cerebrospinal fluid pyruvate levels in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 1995 Oct 27;199(3):231-3. doi: 10.1016/0304-3940(95)12058-c. PMID: 8577405.

Parnetti L, Reboldi GP, Gallai V. Cerebrospinal fluid pyruvate levels in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Neurology*. 2000 Feb 8;54(3):735-7. doi: 10.1212/wnl.54.3.735. PMID: 10680813.

Parra, D., González, A., Mugueta, C. et al. Laboratory approach to mitochondrial diseases. *J. Physiol. Biochem*. 57, 267–284 (2001). <https://doi.org/10.1007/BF03179820>

Picón-Pagès P, Garcia-Buendia J, Muñoz FJ. Functions and dysfunctions of nitric oxide in brain. *BiochimBiophys Acta Mol Basis Dis*. 2019 Aug 1;1865(8):1949-1967. doi: 10.1016/j.bbadis.2018.11.007. Epub 2018 Nov 27. PMID: 30500433.

Pietzner M, Stewart ID, Raffler J, Khaw KT, Michelotti GA, Kastenmüller G, Wareham NJ, Langenberg C. Plasma metabolites to profile pathways in noncommunicable disease multimorbidity. *Nat Med*. 2021 Mar;27(3):471-479. doi: 10.1038/s41591-021-01266-0. Epub 2021 Mar 11. PMID: 33707775; PMCID: PMC8127079.

Redjems-Bennani N, Jeandel C, Lefebvre E, Blain H, Vidailhet M, Guéant JL. Abnormal substrate levels that depend upon mitochondrial function in cerebrospinal fluid from Alzheimer patients. *Gerontology*. 1998;44(5):300-4. doi: 10.1159/000022031. PMID: 9693263.

Reiss, Allison B., Arain, Hirra A., Stecker, Mark M., Siegert, Nicolle M. and Kasselmann, Lora J.. "Amyloid toxicity in Alzheimer's disease" *Reviews in the Neurosciences*, vol. 29, no. 6, 2018, pp. 613-627. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2017-0063>

Reveglia P, Paolillo C, Ferretti G, De Carlo A, Angiolillo A, Nasso R, Caputo M, Matrone C, Di Costanzo A, Corso G. Challenges in LC-MS-based metabolomics for Alzheimer's disease early detection: targeted approaches versus untargeted approaches. *Metabolomics*. 2021 Aug 28;17(9):78. doi: 10.1007/s11306-021-01828-w. PMID: 34453619; PMCID: PMC8403122.

Robinson N, Grabowski P, Rehman I. Alzheimer's disease pathogenesis: Is there a role for folate? *Mech Ageing Dev*. 2018 Sep;174:86-94. doi: 10.1016/j.mad.2017.10.001. Epub 2017 Oct 13. PMID: 29037490.

Roosterman D, Cottrell GS. Rethinking the Citric Acid Cycle: Connecting Pyruvate Carboxylase and Citrate Synthase to the Flow of Energy and Material. *Int J Mol Sci*. 2021 Jan 9;22(2):604. doi: 10.3390/ijms22020604. PMID: 33435350; PMCID: PMC7827294.

Roy C, Tremblay PY, Anassour-Laouan-Sidi E, Lucas M, Forest JC, Giguère Y, Ayotte P. Risk of gestational diabetes mellitus in relation to plasma concentrations of amino acids and acylcarnitines: A nested case-control study. *Diabetes Res ClinPract*. 2018 Jun;140:183-190. doi: 10.1016/j.diabres.2018.03.058. Epub 2018 Apr 4. PMID: 29626588.

Scheltens P, De Strooper B, Kivipelto M, Holstege H, Chételat G, Teunissen CE, Cummings J, van der Flier WM. Alzheimer's disease. *Lancet*. 2021 Apr 24;397(10284):1577-1590. doi: 10.1016/S0140-6736(20)32205-4. Epub 2021 Mar 2. PMID: 33667416; PMCID: PMC8354300.

SHIMIZU K, DORFMAN RI, GUT M. Isocaproic acid, a metabolite of 20 alpha-hydroxycholesterol. *J Biol Chem*. 1960 Jun;235:PC25. PMID: 14446007.

Shimonaka S, Matsumoto SE, Elahi M, Ishiguro K, Hasegawa M, Hattori N, Motoi Y. Asparagine residue 368 is involved in Alzheimer's disease tau strain-specific aggregation. *J Biol Chem*. 2020 Oct 9;295(41):13996-14014. doi: 10.1074/jbc.RA120.013271. Epub 2020 Aug 5. PMID: 32759167; PMCID: PMC7549045.

Shockcor JP, Unger SE, Wilson ID, Foxall PJ, Nicholson JK, Lindon JC. Combined HPLC, NMR spectroscopy, and ion-trap mass spectrometry with application to the detection and characterization of xenobiotic and endogenous metabolites in human urine. *Anal Chem*. 1996 Dec 15;68(24):4431-5. doi: 10.1021/ac9606463. PMID: 8972626.

Sohn, D., Shpanskaya, K., Lucas, J.E. et al. Sex Differences in Cognitive Decline in Subjects with High Likelihood of Mild Cognitive Impairment due to Alzheimer's disease. *Sci Rep* 8, 7490 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25377-w>

Stukas, Sophie K., Iva Kulic, Shahab Zareyan and Cheryl L Wellington. "Chapter 5 Lipids and Lipoproteins in Alzheimer ' s Disease." (2018).

Tanaka, K., Takenaka, S. & Yoshida, K. scyllo-Inositol, a therapeutic agent for Alzheimer's disease. *Austin J. Clin. Neurol.* 2, 1040 (2015)

Tasca CI, Lanznaster D, Oliveira KA, Fernández-Dueñas V and Ciruela F (2018) Neuromodulatory Effects of Guanine-Based Purines in Health and Disease. *Front. Cell. Neurosci.* 12:376. doi: 10.3389/fncel.2018.0037

Tecalco-Cruz AC, Ramírez-Jarquín JO, Alvarez-Sánchez ME, Zepeda-Cervantes J. Epigenetic basis of Alzheimer disease. *World J Biol Chem* 2020; 11(2): 62-75

Wang FY, Liu JM, Luo HH, Liu AH, Jiang Y. Potential protective effects of *Clostridium butyricum* on experimental gastric ulcers in mice. *World J Gastroenterol.* 2015 Jul 21;21(27):8340-51. doi: 10.3748/wjg.v21.i27.8340. PMID: 26217085; PMCID: PMC4507103.

Weaver KE, Richards TL, Logsdon RG, McGough EL, Minoshima S, Aylward EH, Kleinhans NM, Grabowski TJ, McCurry SM, Teri L. Posterior Cingulate Lactate as a Metabolic Biomarker in Amnesic Mild Cognitive Impairment. *Biomed Res Int.* 2015;2015:610605. doi: 10.1155/2015/610605. Epub 2015 Aug 31. PMID: 26417597; PMCID: PMC4568343.

Wilkins JM, Trushina E. Application of Metabolomics in Alzheimer's Disease. *Front Neurol.* 2018 Jan 12;8:719. doi: 10.3389/fneur.2017.00719. PMID: 29375465; PMCID: PMC5770363.

Witkowski M, Weeks TL, Hazen SL. Gut Microbiota and Cardiovascular Disease. *Circ Res.* 2020 Jul 31;127(4):553-570. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.120.316242. Epub 2020 Jul 30. PMID: 32762536; PMCID: PMC7416843.

Wu YY, Kuo HC. Functional roles and networks of non-coding RNAs in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *J Biomed Sci.* 2020 Apr 7;27(1):49. doi: 10.1186/s12929-020-00636-z. PMID: 32264890; PMCID: PMC7140545.

Yang TT, Liu CG, Gao SC, Zhang Y, Wang PC. The Serum Exosome Derived MicroRNA-135a, -193b, and -384 Were Potential Alzheimer's Disease Biomarkers. *Biomed Environ Sci.* 2018 Feb;31(2):87-96. doi: 10.3967/bes2018.011. PMID: 29606187.

Yoshida KI, Ishikawa S. Production of scyllo-Inositol: Conversion of Rice Bran into a Promising Disease-Modifying Therapeutic Agent for Alzheimer's Disease. *J Nutr Sci*

Vitaminol (Tokyo). 2019;65(Supplement):S139-S142. doi: 10.3177/jnsv.65.S139. PMID: 31619615.

Yu F, Feng X, Li X, Luo Y, Wei M, Zhao T, Xia J. Gut-Derived Metabolite Phenylacetylglutamine and White Matter Hyperintensities in Patients With Acute Ischemic Stroke. *Front Aging Neurosci.* 2021 Jul 30;13:675158. doi: 10.3389/fnagi.2021.675158. PMID: 34393756; PMCID: PMC8363199.

Zhang, Z., Song, M., Liu, X., Kang, S.S., Duong, D.M., Seyfried, N.T., Cao, X., Cheng, L., Sun, Y., Yu, S., Levey, A.I. and Ye, K. (2015), P4-203: Asparagine endopeptidase cleaves amyloid precursor protein and promotes amyloidogenesis in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 11: P858-P859. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2015.08.031>

Zhengshan Luo, Shiqin Yu, Weizhu Zeng, Jingwen Zhou, Comparative analysis of the chemical and biochemical synthesis of keto acids, *Biotechnology Advances*, Volume 47, 2021, 107706, ISSN 0734-9750, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107706>.