

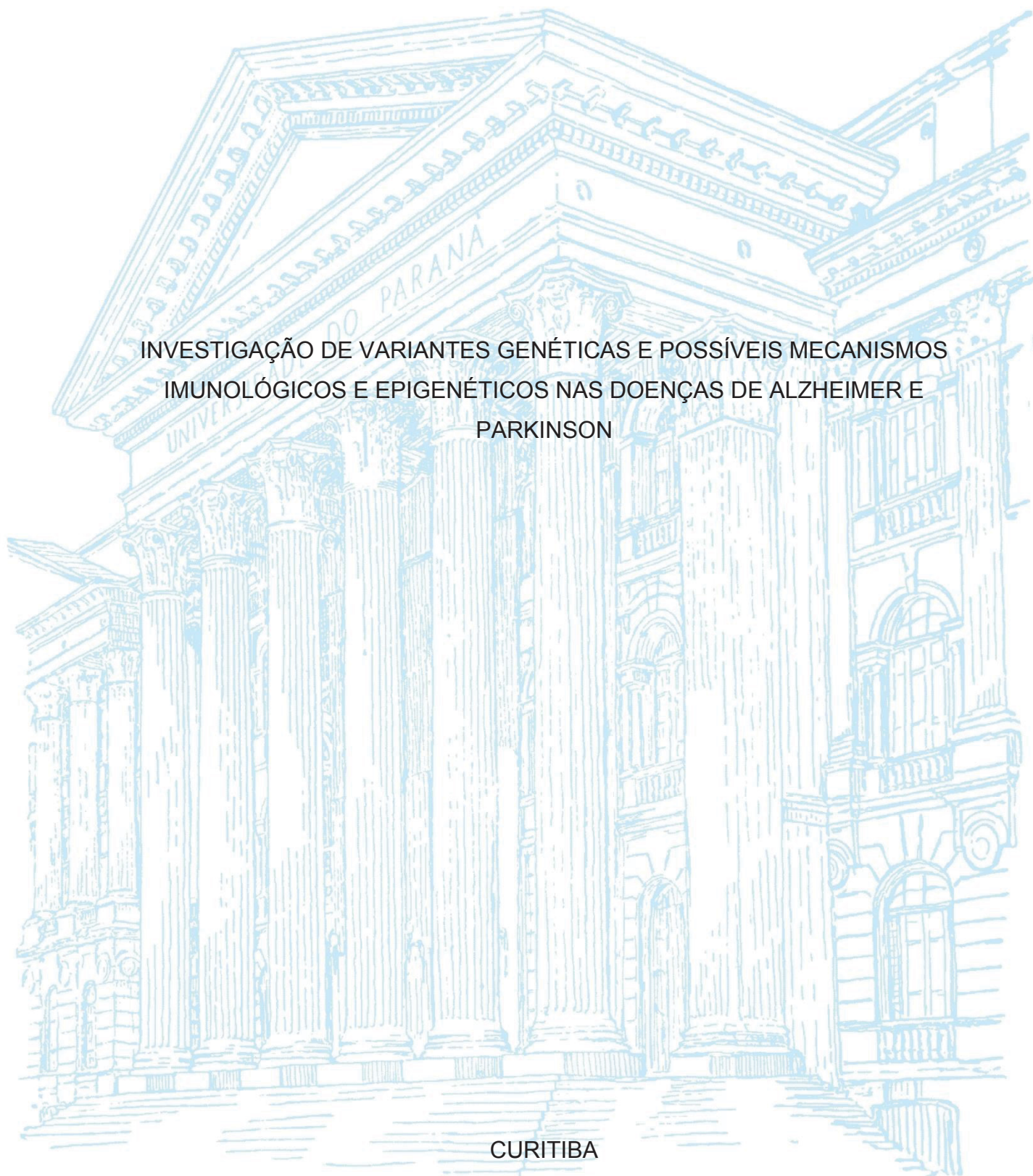
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GABRIELA CANALLI KRETZSCHMAR

INVESTIGAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS E POSSÍVEIS MECANISMOS
IMUNOLÓGICOS E EPIGENÉTICOS NAS DOENÇAS DE ALZHEIMER E
PARKINSON

CURITIBA

2020



GABRIELA CANALLI KRETZSCHMAR

INVESTIGAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS E POSSÍVEIS MECANISMOS
IMUNOLÓGICOS E EPIGENÉTICOS NAS DOENÇAS DE ALZHEIMER E
PARKINSON

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Genética.

Orientadora: Profa. Dra. Angelica B. W. Boldt

Coorientador: Prof. Dr. Marcelo M. S. Lima

CURITIBA

2020

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Kretzschmar, Gabriela Canalli
Investigação de variantes genéticas e possíveis mecanismos
imunológicos e epigenéticos nas doenças de Alzheimer e Parkinson. /
Gabriela Canalli Kretzschmar. – Curitiba, 2020.
233 p.: il.

Orientadora: Angelica B. W. Boldt.
Coorientador: Marcelo M. S. Lima.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Alzheimer, Doença de. 2. Parkinson, Doença de. 3. Epigenômica. 4.
Polimorfismo (Genética). 5. Inflamação. I. Título. II. Boldt, Angelica Beate
Winter, 1973-. III. Lima, Marcelo de Meira Santos, 1978-. IV. Universidade
Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Genética.

CDD (22. ed.) 616.83



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO GENÉTICA -
40001016006P1

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em GENÉTICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de GABRIELA CANALLI KRETZSCHMAR intitulada: **Investigação de variantes genéticas e possíveis mecanismos imunológicos e epigenéticos nas doenças de Alzheimer e Parkinson**, sob orientação da Profa. Dra. ANGELICA BEATE WINTER BOLDT, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 30 de Outubro de 2020.

Assinatura Eletrônica
01/11/2020 23:02:19.0
ANGELICA BEATE WINTER BOLDT
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
03/11/2020 17:33:40.0
MEIRE SILVA BATISTELA
Avaliador Externo (SETOR DE BIOLOGIA MOLECULAR DO
LABORATÓRIO MANTIS DIAGNÓSTICOS AVANÇADOS.)

Assinatura Eletrônica
02/11/2020 11:25:02.0
CLAITON HENRIQUE DOTTO BAU
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO
SUL)

Assinatura Eletrônica
30/10/2020 20:42:29.0
GABRIEL ADELMAN CIPOLLA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Aos meus amados pais, meu marido e filha que são pilares da minha força, e a minha querida avó Iracema que sofreu por tantos anos com a doença de Parkinson.

AGRADECIMENTOS

Ao longo desses anos de pós-graduação, aprendi que fazer ciência é algo que não se faz sozinho. São necessárias muitas pessoas, cada qual desempenhando um papel específico para que um projeto se concretize e um pesquisador nasça. Se cheguei até aqui, é porque tive muitas pessoas que me ajudaram e incentivaram, cada qual a sua maneira, e só tenho a agradecer:

A espiritualidade, que em meio a tantos problemas e imprevistos que tive ao longo desses anos, sempre me deu forças para perseverar e levantar com mais força e determinação.

Aos meus amados pais, que sempre me incentivaram a estudar e fizeram verdadeiros sacrifícios para que eu tivesse uma formação universitária. Nunca vou esquecer o que meu pai sempre me falava: "*nunca ninguém poderá tirar o estudo de você*". Minha gratidão será eterna por tudo que sempre fizeram por mim.

Ao meu marido Rafael S. K., que sempre esteve ao meu lado, mesmo eu estando mentalmente ausente e fisicamente exausta. Obrigado pela compreensão nesses momentos difíceis e pelo incentivo para que eu sempre estudasse e me aperfeiçoasse.

A minha sogra Tereza, que tantas vezes me ajudou cuidando da minha filha para que eu pudesse estudar, me incentivando da melhor maneira possível, mesmo que fosse apenas trazendo um café enquanto eu estudava.

A toda equipe do Laboratório de Genética Molecular Humana (LGMH). Este lugar foi minha casa por quase sete anos, e foi onde me senti em família, aprendi quase tudo que sei, e fiz maravilhosas amizades. Como vou sentir falta desse lugar. Particularmente, agradeço a Priscila, nossa técnica, que sempre foi extremamente prestativa, com soluções geniais e muito compreensiva com milhares de dúvidas sobre concentrações e cálculos variados. Obrigada Pri, eu aprendi muito com você. Ao longo desses anos, foram muitas pessoas que me ajudaram em experimentos, em conversas, dicas, soluções e desabafos, desde os professores (em especial Profa. Maria Luiza Petzl-Erler, a quem sempre admirei muito e para mim é um exemplo de cientista), pós-docs., pós-graduandos, ICs e PVAs, agradeço a todos (gostaria de citar nomes, mas são muitos, então para não cometer injustiças, agradeço a todos de coração). Em particular, agradeço muito a Valéria B. Bini, que se dispôs a me ajudar nos últimos meses, quando a pandemia acabou com meu cronograma e vi o tempo

correndo contra mim. Saiba que sem a sua colaboração, eu não conseguiria apresentar todos os resultados que obtive, muito obrigada. Também agradeço ao Miguel e Emiliano que se dispuseram a ir para Botucatu realizar os experimentos das NETs no laboratório da Profa. Luciana. Agradeço muito aos meninos e a colaboração com a Profa. Luciana e sua equipe, que foram super prestativos e atenciosos.

A minha orientadora Angelica B. W. Boldt. A ti, sempre serei eternamente grata. Você é uma das maiores responsáveis por eu ter chegado até aqui, quando há 6 anos e meio atrás, aceitou uma aluna sem experiência em genética, que mal sabia mexer em uma micropipeta, mas que estava determinada a aprender. Muitos teriam fechado a porta, mas você sempre acreditou no meu potencial e me incentivou a dar o meu melhor, sendo compreensiva nos momentos mais difíceis que enfrentei. Gratidão eterna a oportunidade, ao aprendizado, a compreensão e ao companheirismo.

Agradeço muito ao meu coorientador, Prof. Marcelo M. S. Lima, que aceitou colaborar conosco e que sempre foi muito prestativo e presente no meu trabalho. Agradeço a toda a equipe do Laboratório de Neurofisiologia (UFPR), em especial ao Adriano Targa, por terem realizado a parte da experimentação no modelo animal e por serem sempre tão solícitos quando precisei. Aprendi muito com vocês.

Ao Prof. Ricardo L. R. de Souza e toda equipe do laboratório de Polimorfismo e Ligação da UFPR, pela colaboração e ajuda ao longo desses anos. Sem vocês, nenhum dos trabalhos que realizei com a Doença de Alzheimer seria possível. Muito obrigada.

Agradeço imensamente a colaboração com a Dra. Sheila Coelho (INCA) que realizou o pirosequenciamento nas nossas amostras. Sou muito grata pela pronta disponibilidade e colaboração.

Aos meus amigos Larissa C. V. Gomes e Rodrigo Gomes, que mesmo de longe nunca deixaram de estar presentes, me ouvindo e aconselhando.

Ao programa de pós graduação em genética da UFPR e todos os professores em que sempre que eu batia em suas portas, cheia de dúvidas me atendiam e respondiam prontamente, especialmente Karin B., Patrícia S., Márcia B., Daniela G. e Jaqueline C. O.

As agências de fomento que possibilitaram a realização dos experimentos (CAPES, CNPq e Fundação Araucária).

“A vida não é fácil para nenhum de nós. Mas e daí? Nós devemos ter persistência e, acima de tudo, confiança em nós mesmos. Devemos acreditar que somos talentosos em alguma coisa, e que essa coisa, deve ser alcançada.”

Marie Curie

RESUMO

Estima-se que o aumento na expectativa de vida resulte numa elevação de demências em 225% até 2050, principalmente doenças neurodegenerativas esporádicas em indivíduos com mais de 65 anos. Dentre estas, a doença de Alzheimer (DA) e doença de Parkinson (DP), correspondem às mais frequentes, e ainda carecem de cura e compreensão dos mecanismos e fatores etiológicos envolvidos. A DA apresenta acúmulo de placas β -amiloide (β A) e emaranhados neurofibrilares extracelulares (ENF), resultando na perda neuronal e atrofia cerebral, causando perda de memória e cognição. Já na DP ocorre a perda progressiva de neurônios dopaminérgicos da substância nigra *pars compacta* (SNpc) e das projeções do corpo estriado, além de inclusões citoplasmáticas de agregados de proteínas insolúveis (Corpos de Lewy), levando à rigidez muscular e alterações do movimento, com presença de tremor, e ocasionalmente quadros depressivos e demenciais. Logo, a investigação de fatores de risco nessas doenças, ampliando o conhecimento de sua etiologia e propondo novos alvos terapêuticos, é extremamente urgente. Com este objetivo, buscamos replicar na população sul-brasileira polimorfismos associados a DA em populações europeias. Também investigamos três polimorfismos sem relato prévio de associação, genotipando até 150 pacientes e 114 controles para 23 polimorfismos ao total (PCR-SSP e iPLEX MassARRAY). Para os polimorfismos associados, realizamos extensa investigação *in silico* para avaliar seu possível papel funcional. Adicionalmente, mensuramos o receptor 1 do complemento solúvel (sCR1) em plasma de pacientes e controles através de ensaio de imunoabsorção ligada a enzima (ELISA). Para avaliar uma das vias da neuroinflamação, investigamos a presença de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) no plasma de pacientes e controles, através de ELISA. Também investigamos a regulação do gene *Kynu* (quinureninase da via das quinureninas) em até 22 ratos induzidos a DP, através de injeção de rotenona, e 18 ratos sham. Investigamos o padrão de metilação de dois sítios CpG (pirosequenciamento) e a expressão gênica de *Kynu* (RT-qPCR), correlacionando os dados obtidos com a análise do teste de reconhecimento de objeto (RDO), em grupos suplementados ou não, com ácido fólico e vitamina B12. Por meio dos resultados, evidenciou-se a importância da replicação de associações em diferentes populações, pois apenas quatro variantes de 20 permaneceram associadas na população sul-brasileira. A análise *in silico* mostrou que um dos polimorfismos avaliados, e oito variantes em desequilíbrio de ligação, encontram-se na sequência de seis longos RNA não codificadores, até então não associados a DA. Relatamos a primeira associação de polimorfismos de *CR1* em uma população latino-americana, com o rs3849266 formando um haplótipo com rs2274567 (CA/CA), até então não investigado na DA, destacando a importância de análises haplotípicas com variantes em região regulatória. Pela primeira vez, evidenciamos a formação de NETs em pacientes sul-brasileiros de DA, discutindo a possibilidade de envolvimento do sistema complemento no recrutamento dos neutrófilos às placas. Por fim, evidenciamos que uma intervenção simples com suplementação de ácido fólico e vitamina B12 pode prevenir o comprometimento da memória causado pela rotenona no modelo de DP, podendo esta intervenção ser cogitada como uma terapia auxiliar para redução de sintomas em pacientes com DP.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer. Doença de Parkinson. Epigenética. Neuroinflamação. Polimorfismos.

ABSTRACT

It is estimated that the rise in life expectancy results in an increase in dementia by 225% until 2050, mainly sporadic neurodegenerative diseases in individuals over 65 years of age. Among these, Alzheimer's disease (AD) and Parkinson's disease (PD) correspond to the most frequent and still lack a cure and understanding of the mechanisms and etiological factors involved. AD presents an accumulation of β -amyloid plaques (β A) and extracellular neurofibrillary tangles (NFT), resulting in neuronal loss and cerebral atrophy, causing loss of memory and cognition. In PD, there is a progressive loss of dopaminergic neurons of the substantia nigra *pars compacta* (SNpc) and striatum projections, in addition to cytoplasmic inclusions of insoluble protein aggregates (Lewy bodies), leading to muscle stiffness and movement changes, presence of tremor, and occasionally depression and dementia. Therefore, investigating risk factors in these diseases, expanding the knowledge on their etiology, and proposing new therapeutic targets is extremely urgent. With this objective, we seek to replicate in the South Brazilian population polymorphisms associated with AD in European populations. We also investigated three polymorphisms with no previous association report, genotyping up to 150 patients, and 114 controls, totalizing 23 polymorphisms (PCR-SSP and iPLEX MassARRAY). For associated polymorphisms, we have carried out extensive *in silico* research to assess their possible functional role. Additionally, we measured the soluble complement receptor (sCR1) in patients and controls plasma using the enzyme-linked immunoadsorbent assay (ELISA). To assess one of the pathways of neuroinflammation, we investigated the presence of neutrophil extracellular traps (NETs) in the plasma of patients and controls, using ELISA. We also investigated the regulation of the *Kynu* gene (*Kynureninase* from the Kynurenine pathway) in up to 22 rats induced for PD through rotenone injection, and 18 sham rats. We investigated the methylation pattern of two CpG sites (pyrosequencing) and *Kynu* gene expression (RT-qPCR), correlating with the data obtained with the analysis of the Object Recognition Task test (ORT), in groups supplemented or not, with folic acid and vitamin B12. The importance of replicating associations in different populations became evident through the results, as only four variants of 20 were associated in the Southern Brazilian population. The *in silico* analysis showed that one of the evaluated polymorphisms, and eight variants in linkage disequilibrium, are found in the sequence of six long non-coding RNA genes, hitherto not associated with AD. We report the first association of CR1 polymorphisms in a Latin-American population, with rs3849266 forming an haplotype with rs2274567 (CA / CA), hitherto not investigated in AD, highlighting the importance of haplotypic analyzes with variants in regulatory regions. For the first time, we have evidenced the formation of NETs in Southern Brazilian patients with AD, raising the possibility of involvement of the complement system in the recruitment of neutrophils to plaques. Finally, we show that a simple intervention with folic acid and vitamin B12 supplementation can prevent memory impairment caused by rotenone in the PD model. This intervention can be considered a potential auxiliary therapy to reduce symptoms in PD patients.

Keywords: Alzheimer's disease. Parkinson's Disease. Epigenetics.

Neuroinflammation. Polymorphisms.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - BIOMARCADORES DA DOENÇA DE ALZHEIMER	24
FIGURA 2 - PROCESSAMENTO DA PROTEINA PRECURSORA AMILOIDE E GERAÇÃO DAS PLACAS.....	26
FIGURA 3 - VIAS DE ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO.	30
FIGURA 4 - MECANISMOS DE REMOÇÃO DE PLACAS β A E ATIVAÇÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO	31
FIGURA 5 - FORMAÇÃO DAS NETS.....	34
FIGURA 6 - POSSÍVEIS EFEITOS DA PRODUÇÃO DE NETs NA DA.....	36
FIGURA 7 - PERSPECTIVA DE NÚMERO DE CASOS DE DOENÇA DE ALZHEIMER NOS ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA (USA) ATÉ 2050.....	38
FIGURA 8 - PERCENTUAL DE AFETADOS PELA DA POR FAIXA ETÁRIA EM 2020 NOS USA.....	39
FIGURA 9 - COMPARAÇÃO ANATÔMICA ENTRE ENCEFÁLO DE PACIENTE COM DA E INDIVÍDUO SEM A PATOLOGIA	40
FIGURA 10 - DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE ALZHEIMER COMO UM CONTINUUM	42
FIGURA 11 - GENES ASSOCIADOS COM A DA E SUA RELAÇÃO DE RISCO NA DOENÇA.....	46
FIGURA 12 - ARQUITETURA GENÔMICA DA DOENÇA DE ALZHEIMER	46
FIGURA 13 - ISOFORMAS DA APOE, FREQUÊNCIA POPULACIONAL E ESTRUTURA DA MOLÉCULA.....	48
FIGURA 14 - TRANSCRITOS DO <i>CR1</i>	49
FIGURA 15 - EXPRESSÃO DE <i>CR1</i> EM DIFERENTES TECIDOS.....	50
FIGURA 16 - ARQUITETURA GENÔMICA DO LOCUS DE <i>CR1</i> EM RELAÇÃO ÀS PRINCIPAIS ISOFORMAS.	51
FIGURA 17 – ESTRUTURA GÊNICA E MOLECULAR DO <i>CR1</i>	52
FIGURA 18 - SINTOMAS DA DP AO LONGO DO TEMPO.....	58
FIGURA 19 - EVOLUÇÃO DA DESPIGMENTAÇÃO DA SUBSTÂNCIA <i>NIGRA</i> EM CORTES TRANSVERSAIS DO MESENCÉFALO.....	60
FIGURA 20 - ALTERAÇÕES NO CICLO DO UM CARBONO DECORRENTE DO CATABOLISMO DE LEVODOPA.....	64

FIGURA 21 - ARQUITETURA GENÔMICA NA DP.....	68
FIGURA 22 - COMPOSIÇÃO DE UM NUCLEOSSOMO HIPOTÉTICO COM MODIFICAÇÕES NAS CAUDAS DAS HISTONAS.....	70
FIGURA 23 - METILAÇÃO, HIDROXILAÇÃO E DESMETILAÇÃO DA CITOSINA NO DNA	73
FIGURA 24 - PROCESSO DE METILAÇÃO DO DNA.....	74
FIGURA 25 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO METABOLISMO DO UM CARBONO.....	76
FIGURA 26 - VIA DAS QUINURENINAS	80
FIGURA 27 - TRANSCRITOS DO GENE <i>KYNU</i> EM HUMANOS	83
FIGURA 28 - TRANSCRITO DO GENE <i>Kynu</i> EM RATOS (<i>Rattus norvegicus</i>)	83
FIGURA 29 - EXPRESSÃO DO GENE <i>KYNU</i> EM TECIDOS HUMANOS.....	84
FIGURA 30 - IDENTIDADE DE SEQUÊNCIA DO GENE <i>KYNU</i> ENTRE HUMANOS E RATOS	84
FIGURA 31 – ESTRUTURA EM 3D DA KYNU EM HUMANOS.....	85
FIGURA 32 - EXPRESSÃO DE KYNU EM DIFERENTES TECIDOS.....	86

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - POSSÍVEIS MECANISMOS ENVOLVIDOS DA FISIOPATOLOGIA DA DP	61
TABELA 2 - EXEMPLOS DE MODIFICAÇÕES EPIGENÉTICAS RELATADAS EM DP	71

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

3-HANA	- Ácido 3-hidroxi-antranílico / 3-hydroxyanthranilic acid
3-HAO	- 3-hidroxiantranílico-3,4- dioxigenase / 3-hydroxyanthranilic acid 3,4-dioxygenase
3-HK	- 3-hidroxiquinurenina / 3-hydroxykynurenine
5-HIAA	- 5-hidroxi-indoleacético / 5-hydroxyindoleacetic acid
5hmC	- Citosina 5-hidroximetil / 5-hydroxymethylcytosine
5-HT	- Serotonina / Serotonin
5-HTP	- 5-hidroxitriptofano / 5-hydroxytryptophan
βA / Aβ	- Beta-amiloide / Amyloid - beta
AA	- Ácido antranílico / Anthranilic acid
ACS	-Semi-aldeído 2-aminocarboximucônico / 2-amino-3-carboxymuconic-6-semialdehyde
APOE	- Apolipoproteína E / Apolipoprotein E
AUC	- Área sob a curva / Area under the curve
BACE1	- Beta-secretase 1
PPA / APP	- Proteína Precursora Amiloide / Amyloid Precursor Protein
AQ / QUIN	- Ácido quinolínico / Quinolinic acid
AS	-Semialdeído-2-aminomucônico / 2-aminomuconic-6-semialdehyde
ASD	- Descarboxilase 2-amino-3-carboximucônico-6-semialdeído / 2-amino-3-carboxymuconic- 6-semialdehyde decarboxylase
AVC	- Acidente vascular cerebral / Stroke
BHE / BBB	- Barreira hematoencefálica / Blood-brain barrier
CCL / MCI	- Comprometimento cognitivo leve / <i>Mild Cognitive Impairment</i>
CR1	- Receptor 1 do complemento / Complement Receptor 1
DA / AD	- Doença de Alzheimer / Alzheimer's disease
DP / PD	- Doença de Parkinson / Parkinson's Disease
DAMPs	- Padrões moleculares associados a dano / Danger-associated molecular patterns
EM / NE	- Elastase neutrofílica / Neutrophil elastase
ENF / NFT	- Emaranhados neurofibrilares / Neurofibrillary Tangles
eQTL	- Locus de característica quantitativa / Quantitative trait locus

EROs / ROS	- Espécies reativas de oxigênio / Reactive oxygen species
fAD	- Doença de Alzheimer familiar / Familial Alzheimer's disease
GWAS	- Estudo de Associação de Genoma Total / Genome-wide Association Study
ICAM-1	- Molécula 1 de adesão intercelular / Intercellular Adhesion Molecule 1
IDO	- Indoleamina-2,3-dioxigenase / Indoleamine 2,3-dioxygenase
KATs	- Quinurenina aminotransferases / Kynurenine aminotransferases
KMO	- Quinurenina 3-monoxigenase / Kynurenine 3-monooxygenase
LCR	- Low Copy Repeat
LFA-1	- Antígeno 1 associado à função linfocitária / Lymphocyte function-associated antigen 1
LHR	- Longas Repetições Homólogas / Long homologous repeating
lncRNA	- RNA longo não codificador / Long noncoding RNA
LOAD	- Doença de Alzheimer de Início Tardio – Late-onset Alzheimer's Disease
miRNA	- micro-RNA
MPO	- Mieloperoxidase / Myeloperoxidase
NAD⁺	- Dinucleótido de nicotinamida e adenina / Nicotinamide adenine dinucleotide
ncRNAs	- RNAs não codificantes / Noncoding RNAs
NETs	- Armadilhas extracelulares de neutrófilos / Neutrophil extracellular trap
NMDA	- N-metil-D-aspartato / N-methyl- D-aspartate
PAMPs	- Padrões moleculares associados a dano patógenos / Pathogen-associated molecular patterns
PSEN 1	- Preselina 1 / Presenilin 1
PSEN 2	- Preselina 2 / Presenilin 2
QPRT	- Quinolinato fosforibosil transferase / Quinolinic acid phosphoribosyl transferase
QUIN / KYN	- Quinurenina / Kynurenine
QUINA / KYNA	- Ácido quinurênico / Kynurenic acid
QUINU / KYNU	- Quinureninase / Kynureninase
SAM	- S-adenosil metionina / S-adenosylmethionine

SAH	- S-adenosil-homocisteína / S-adenosylhomocysteine
SC / CS	- Sistema complemento / Complement system
SNC / CNS	- Sistema nervoso central / Central nervous system
SNpc	- Substância <i>nigra pars compacta</i> / Substantia <i>nigra pars compacta</i>
SNPs	- Polimorfismos de nucleotídeos único / Single nucleotide polymorphisms
TDO	- Triptofano 2,3-dioxigenase / Tryptophan 2.3 dioxygenase
TLR	- Receptores Semelhantes a Toll / Toll-Like Receptors
TPH	- Triptofano hidroxilase / Tryptophan hydroxylase
TRP	- Triptofano / Thyptophan
UNV / NVU	- Unidade neurovascular / Neurovascular unit
XA	- Ácido xanturênico / Xanthurenic acid

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1 DOENÇA DE ALZHEIMER (DA)	23
2.1.1 A doença e seus aspectos clínicos	23
2.1.1.1 Hipótese da cascata amiloide	25
2.1.1.2 Hipótese metabólica e vascular	26
2.1.1.3 Hipótese da neuroinflamação	27
2.1.1.3.1 O sistema complemento	28
2.1.1.3.2 Células envolvidas no processo de neuroinflamação na DA	31
2.1.1.3.3 Formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs)	33
2.1.1.3.4 NETs no Alzheimer	35
2.1.2 Epidemiologia	38
2.1.3 Fisiopatologia	39
2.1.4 Diagnóstico e tratamento	41
2.1.5 Genética	44
2.1.5.1 Receptor 1 do complemento (CR1)	49
2.1.5.2 Loci de associação a fenótipos de expressão quantitativa (QTLs)	54
2.1.5.3 RNAs não codificantes (ncRNAs)	55
2.2 DOENÇA DE PARKINSON (DP)	57
2.2.1 A doença e seus aspectos clínicos	57
2.2.2 Epidemiologia	58
2.2.3 Fisiopatologia	59
2.2.4 Diagnóstico e tratamento	62
2.2.5 Genética	66
2.2.6 Regulação epigenética	68
2.2.6.1 Metilação do DNA	71
2.2.6.1.1 O ciclo do um carbono	75
2.2.7 A via do Triptofano	78
2.2.7.1 O envolvimento das KYNs na Doença de Parkinson	82
2.2.7.2 Gene <i>KYNU</i>	82
2.2.7.2.1 Estrutura e regulação	82
2.2.7.2.2 A quinureninase (<i>KYNU</i>)	85

2.3 SOBREPOSIÇÃO ENTRE DA E DP	87
3 HIPÓTESE E JUSTIFICATIVA	88
4 OBJETIVOS.....	89
4.1 OBJETIVO GERAL	89
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	89
4.2.1 Objetivos específicos para trabalhos desenvolvidos com a DA	89
4.2.2 Objetivos específicos para o trabalho desenvolvido com a DP	89
5 DESCRIÇÃO DOS CAPÍTULOS	91
6 CAPÍTULO 1 – CR1 E DA	92
6.1 ABSTRACT	93
7 CAPÍTULO 2 – REPLICAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM DA.....	94
7.1 ABSTRACT	95
7.2 INTRODUCTION	96
7.3 MATERIAL AND METHODS	96
7.3.1 Ethics approval.....	98
7.3.2 Association study	98
7.3.2.1 Research participants.....	98
7.3.2.2 Polymorphisms selection and genotyping.....	99
7.3.2.3 Association analysis	102
7.3.3 In silico analysis	102
7.3.3.1 Linkage disequilibrium (LD)	103
7.3.3.2 Search for associations in the literature.....	103
7.3.3.3 Expression and splicing quantitative trait locus (eQTLs/sQTLs).....	103
7.3.3.4 Investigation of noncoding RNAs (ncRNAs) possibly related to AD through the associated or LD variants.....	103
7.3.3.5 Secondary structure of lncRNA prediction	104
7.3.3.6 Investigation of miRNAs that are possibly affected by the presence of variants in lncRNAs.....	104
7.4 RESULTS.....	105
7.4.1 Association study	105
7.4.2 In silico analysis	106
7.4.2.1 Identification of variants in LD, eQTL/sQTL effect, and interference in ncRNAs.....	106
7.4.2.2 Characterization and secondary structure of candidate lncRNAs.....	107

7.4.2.3 miRNA binding sites affected by SNPs in lncRNAs	108
7.5 DISCUSSION	111
7.6 ACKNOWLEDGMENTS	114
7.7 REFERENCE	116
7.8 SUPPLEMENTARY MATERIAL.....	123
8 CAPÍTULO 3 – SISTEMA COMPLEMENTO E NETS EM DA.....	134
8.1 ABSTRACT	135
8.2 INTRODUCTION.....	136
8.3 ALZHEIMER’S DISEASE AND THE COMPLEMENT SYSTEM.....	136
8.4 ALZHEIMER’S DISEASE AND NETS	138
8.4.1 C5a-C5aR1 axis and the relation with NETs and AD	138
8.4.2 CR1 and its relationship with NETs and AD	139
8.4.3 C1q and the relation with NETs and AD	140
8.4.4 High NETs levels in a Brazilian cohort.....	142
8.5 CONCLUDING REMARKS.....	143
8.6 ETHICS STATEMENT.....	143
8.7 ACKNOWLEDGMENTS	144
8.8 REFERENCES.....	145
8.9 SUPPLEMENTARY MATERIAL.....	153
9 CAPÍTULO 4 – EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO EM DP	154
9.1 ABSTRACT	155
9.2 HIGHLIGHTS	156
9.3 GRAPHIC ABSTRACT	156
9.4 INTRODUCTION.....	157
9.5 MATERIAL AND METHODS	158
9.5.1 Subjects.....	158
9.5.2 Experimental design	159
9.5.3 Stereotaxic surgery	160
9.5.4 Supplementation procedure	160
9.5.5 Object Recognition Task test (ORT).....	161
9.5.6 Methylation levels analysis	161
9.5.7 Gene expression analysis	162
9.5.8 Statistical analysis	163
9.6 RESULTS.....	163

9.6.1 Object Recognition Task test (ORT).....	163
9.6.2 DNA methylation level differences between groups	164
9.6.3 DNA methylation level differences between the brain regions.....	165
9.6.4 <i>Kynu</i> expression	166
9.7 DISCUSSION	167
9.8 CONCLUSION	173
9.9 ACKNOWLEDGMENTS	173
9.10 REFERENCES.....	175
9.11 SUPPLEMENTARY MATERIAL.....	183
10 CONCLUSÕES	187
REFERÊNCIAS.....	189
APÊNDICE 1 – COMITÊ DE ÉTICA – AMOSTRAS DE ALZHEIMER.....	224
APÊNDICE 2 – APROVAÇÃO DE USO DE ANIMAIS PELO CEUA/BIO - UFPR.....	229
ANEXO 1 – MINI-EXAME DO ESTADO MENTAL (MEEM).....	230
ANEXO 2 – ATIVIDADES INSTRUMENTAIS DE VIDA DIÁRIA (PFEFFER)	231
ANEXO 3 – AVALIAÇÃO CLÍNICA DE DEMÊNCIA (CDR).....	232
ANEXO 4 - ESCALA DE DEPRESSÃO GERIÁTRICA (GDS).....	233

1 INTRODUÇÃO

Com o aumento da expectativa de vida da população, estima-se que demências associadas à idade aumentem 225% em número, de 2010 a 2050 (PRINCE et al., 2013). Dentre estas, as doenças neurodegenerativas são responsáveis por grande parte dos números de casos e afetam normalmente pessoas acima dos 65 anos (forma esporádica), embora também se expressem em menor número de forma precoce (familiar). Sua ocorrência leva a progressivos danos neuronais, com deterioração gradual das funções e controle do sistema nervoso, apresentando como principal marcador patológico o acúmulo de proteínas características em agregados insolúveis em, ou entre, neurônios e células gliais (KWOK, 2010; BRETTSCHEIDER et al., 2015). Dentre essas doenças, as de maior frequência na população de idosos são a doença de Alzheimer (DA) e a doença de Parkinson (DP) (DUTHEY, 2013; DRAOUI et al., 2020).

A DA apresenta como característica neuropatológica principal, o acúmulo de placas da proteína β -amiloide (β A) e emaranhados neurofibrilares extracelulares (ENF). Este acúmulo leva à perda neuronal e atrofia cerebral, desencadeando quadros de perda de memória e demais capacidades cognitivas (SMITH, 1999). Esta doença apresenta diversos polimorfismos gênicos associados, grande parte encontrados por estudos de associação do genoma total (GWAS) (LAMBERT et al., 2009, 2013; CRUCHAGA et al., 2013). Dessa maneira, muitas dessas associações não possuem, até o momento, uma explicação funcional dentro da fisiopatologia da DA. Além disso, vários desses polimorfismos encontram-se em genes envolvidos com a resposta imune e o processo neuroinflamatório, que está intimamente relacionado com a patologia da DA (DU et al., 2018; MORGAN et al., 2019). Recentemente, foi relatada a formação de armadilhas extracelulares pelos neutrófilos (NETs) em cérebro de pacientes com DA, reforçando ainda mais a importância da neuroinflamação (ZENARO et al., 2015; PIETRONIGRO et al., 2017). Estudos que elucidem o papel da neuroinflamação na DA e desvendem o papel funcional desses polimorfismos são de extrema urgência e relevância para a compreensão dessa doença.

Na DP, ocorre a perda progressiva de neurônios dopaminérgicos da substância nigra *pars compacta* (SNpc) e das projeções do corpo estriado, apresentando também inclusões citoplasmáticas de agregados de proteínas insolúveis (como a α -sinucleína), denominados Corpos de Lewy. Como resultado

desse processo, observa-se sintomatologia típica de rigidez muscular, tremor, bradicinesia e instabilidade postural, além de, em alguns casos, quadros depressivos e demenciais (LOTHARIUS e BRUNDIN, 2002; MIGLIORE e COPPEDÈ, 2009; URDINGUIO et al., 2009; KAPEZINSKI et al., 2011). Diferentes vias metabólicas têm sido investigadas e associadas com essa patologia, sendo uma delas a via das quinureninas (FAGOTTI et al., 2019; IWAOKA et al., 2020). Recentemente, foi observado em modelo animal da DP um excesso de quinurenina, um metabólito importante da via, já associado com outras doenças neurológicas (ZWILLING et al., 2011; LOVELACE et al., 2017; FAGOTTI et al., 2019). Nesse sentido, investigações envolvendo essa via e a sua regulação podem auxiliar a elucidar o seu papel na fisiopatologia da doença.

Sendo assim, pretende-se replicar polimorfismos gênicos associados a DA, na população sul brasileira, assim como investigar o possível papel funcional dessas variantes. Considerando a importância da neuroinflamação na DA e o recente relato da presença de NETs em pacientes, buscamos analisar o seu papel na doença. Além disso, procuramos compreender a regulação epigenética do gene *KYNU* (um dos responsáveis pelo processamento da quinurenina) da via das quinureninas, testando possíveis alterações no mecanismo de regulação da expressão gênica através da suplementação com ácido fólico e vitamina B12, e verificando o papel desse gene, na fisiopatologia da DP.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DOENÇA DE ALZHEIMER (DA)

2.1.1 A doença e seus aspectos clínicos

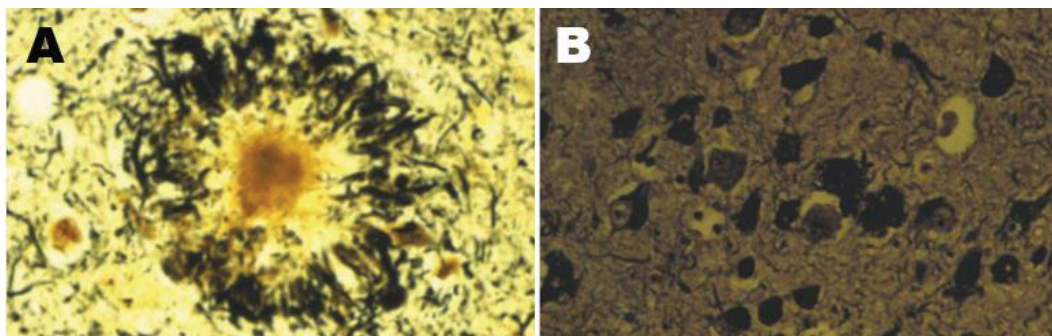
A doença de Alzheimer (DA) (OMIM #104300) é a doença neurodegenerativa progressiva mais comum entre idosos, sendo responsável pela maioria dos casos de demência no mundo (MIGLIORE; COPPEDÈ, 2009; KWOK, 2010; DUTHEY, 2013; ALZHEIMER'S-ASSOCIATION, 2020). A DA foi descoberta em 1906 pelo psiquiatra e neurologista alemão Dr. Alois Alzheimer, que a descreveu como uma “doença peculiar do córtex cerebral”, baseado nas entrevistas e autópsia de sua paciente Auguste Deter (ALZHEIMER, 1907).

De maneira geral, a sintomatologia nessa patologia corresponde a um progressivo declínio cognitivo que abrange as áreas da memória, raciocínio, linguagem, capacidade de aprendizado, além de levar a alterações bruscas de humor e alterações visuais. Os sintomas são resultantes da perda sináptica e morte neuronal iniciada na região do hipocampo, que progride posteriormente para as demais áreas cerebrais (MIGLIORE; COPPEDÈ, 2009; DUTHEY, 2013; ASSOCIATION, 2017). O sintoma inicial e mais comum é a piora gradual na capacidade de lembrar novas informações, o que normalmente leva a primeira procura por orientações médicas, embora pesquisas sugiram que as alterações patológicas iniciem até 20 anos antes dos primeiros sintomas (JACK et al., 2009; ASSOCIATION, 2017). É importante ressaltar que os sintomas de DA podem iniciar e se desenvolver de maneira diferente entre os indivíduos (ASSOCIATION, 2017).

São considerados biomarcadores da doença o acúmulo de fragmentos da proteína beta-amiloide (β A) (formando as placas β A) no meio extracelular, e o acúmulo dentro dos neurônios, da proteína tau hiperfosforilada, criando emaranhados neurofibrilares (ENF do inglês *Neurofibrillary Tangles* - NFT) (FIGURA 1) (ASSOCIATION, 2017; ARSHAVSKY, 2020). Considera-se que as placas β A contribuam para a perda da comunicação interneuronal (sinapses) e ativação da neuroinflamação, e os ENFs bloqueiam o transporte de nutrientes e demais processos celulares essenciais dentro dos neurônios, desencadeando a morte celular (ASSOCIATION, 2017; OFFRINGA-HUP, 2020; ABEYSINGHE et al., 2020). Os

cérebros de pessoas com DA em estágio avançado apresentam processo inflamatório e encolhimento dramático de volume, devido à perda celular (HUANG; MUCKE, 2012; ASSOCIATION, 2017).

FIGURA 1 - BIOMARCADORES DA DOENÇA DE ALZHEIMER



A – Fotomicrografia de uma placa amiloide; B – Fotomicrografia de emaranhados neurofibrilares nos corpos celulares. FONTE: Adaptado de (SISODIA; ST GEORGE-HYSLOP, 2002)

Existem diversos fatores que são considerados como de risco ou protetivos ao desenvolvimento da DA. A idade avançada, histórico familiar e genética¹, doenças cardiovasculares e do metabolismo (como hipertensão, diabetes, dislipidemias e obesidade), traumatismo cranianos e escolaridade baixa, são considerados fatores de risco que podem levar a um aumento na susceptibilidade a DA. Já o engajamento social e cognitivo com níveis de escolaridade altos, são considerados protetivos (FROTA et al., 2016; LANE et al., 2018; ALZHEIMER'S-ASSOCIATION, 2020).

Com mais de um século desde sua descoberta, ainda não há cura para DA e sua etiologia ainda não é completamente elucidada, levando a diversas hipóteses sobre seu surgimento, que de maneira geral, não são excludentes entre si. Nessa revisão bibliográfica, focaremos nas hipóteses da cascata amiloide (devido a geração das placas β A), metabólica e neuroinflamatória, pois são as que apresentam o envolvimento dos produtos dos genes e mecanismos analisados experimentalmente nesse trabalho.

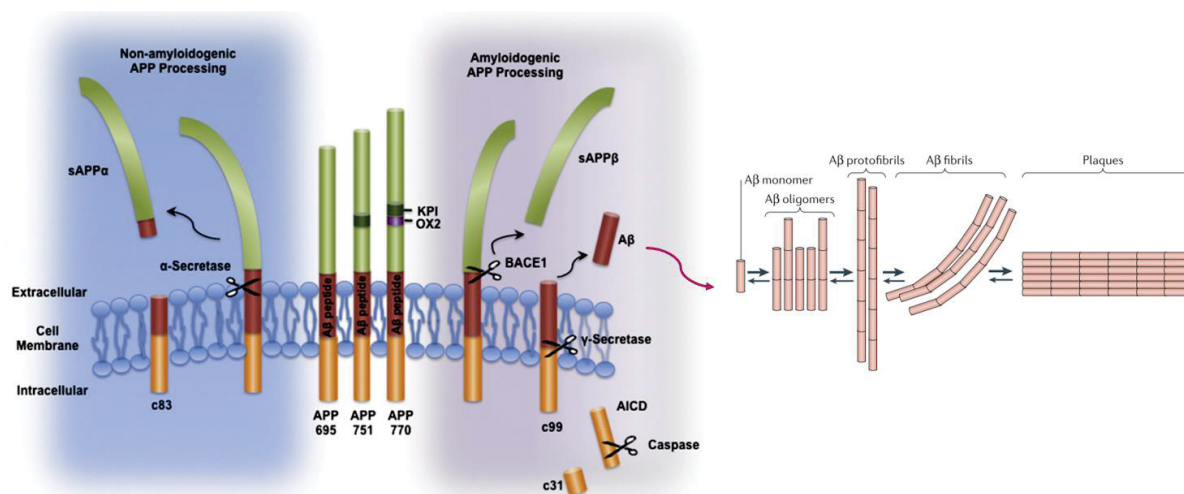
¹ Fatores genéticos envolvidos na DA serão detalhados no item 2.1.5 dessa tese.

2.1.1.1 Hipótese da cascata amiloide

A amiloidogênese é um mecanismo que ocorre em situações normais no cérebro, sendo considerado um processo neuroprotetor. Porém, quando há o acúmulo excessivo ou problemas na depuração extracelular dos peptídeos β A, ocorre um processo patológico (FROTA et al., 2016). Postulada no início da década de 90 (HARDY; HIGGINS, 1992), a hipótese da cascata amiloide explica a formação das placas β A e considera que a deposição de peptídeos β A constituem o gatilho inicial da doença, sendo que a formação de ENFs, morte celular e demência seriam consequências desse processo (KWOK, 2010; REITZ, 2012).

Os peptídeos β A são resultantes do processamento da proteína precursora amiloide (PPA/APP), a qual aparenta ter funções fisiológicas fundamentais na neuroplasticidade (FALCO et al., 2015). A APP é uma proteína integral de membrana do tipo 1, que contém um peptídeo sinal amino-terminal, um grande ectodomínio com sítios para N-glicosilação, uma única hélice de membrana e um domínio citoplasmático curto (SCHONROCK et al., 2012). Em humanos, a proteína expressa pode ser resultante de três isoformas (695 / 751 / 770), sendo que em neurônios, a isoforma predominante é a 695 (SCHONROCK et al., 2012; CANOBBIO et al., 2015). Essa proteína pode ser processada através da via não amiloidogênica ou amiloidogênica. No processamento não amiloidogênico, a APP é processada pela α -secretase, gerando a APP α solúvel e um fragmento C83-terminal, que posteriormente será processado pela γ -secretase, originando o fragmento P3. Já no processamento amiloidogênico, a APP é processada primeiramente pela β secretase (BACE1), originando APP β solúvel e um fragmento C99-terminal. Esse fragmento é novamente processado, agora por um complexo γ -secretase, resultando em um monômero β A e um fragmento AICD (domínio intracelular da APP), que será clivado por caspases, gerando o fragmento C31-terminal. O local de clivagem utilizado pela γ -secretase na via amiloidogênica determina se as espécies de β A serão predominantemente β A40 ou β A42 (que correspondem às espécies mais agregadas e neurotóxicas). Posteriormente, há agregação dos monômeros em oligômeros, que se juntam formando as fibrilas e, em seguida, as placas (FIGURA 2) (SCHONROCK et al., 2012; CANOBBIO et al., 2015; HEPPNER et al., 2015).

FIGURA 2 - PROCESSAMENTO DA PROTEINA PRECURSORA AMILOIDE E GERAÇÃO DAS PLACAS



FONTE: adaptado de SCHONROCK et al., 2012 e HEPPNER et al., 2015.

Diversos autores demonstraram que nas formas familiares da doença, há mutações no gene da APP, das preselinas 1 (*PSEN1*) e 2 (*PSEN2*), que codificam o complexo γ -secretase envolvido na produção de βA^2 , reforçando a ideia dessa hipótese (HEPPNER et al., 2015).

2.1.1.2 Hipótese metabólica e vascular

Do ponto de vista metabólico, o cérebro humano é um dos órgãos mais ativos do corpo, necessitando de um alto suprimento de glicose para produção de energia e execução de suas funções (FALCO et al., 2015). Pacientes com DA apresentam uma redução na taxa metabólica de glicose em áreas regionais do cérebro, particularmente no córtex cingulado posterior, no giro parahipocampal e nas áreas occipitais, sugerindo vias neurofisiológicas comuns de degeneração (MOSCONI et al., 2003; YIN et al., 2016), sendo que essas alterações podem ocorrer décadas antes dos primeiros sintomas (FROTA et al., 2016). Além disso, vários autores já demonstraram que a insulina é importante no processamento da memória, sendo capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) e ser produzida constitutivamente no cérebro. Pacientes com DA apresentam uma redução nos níveis de insulina, assim como uma

² A relação com as associações genéticas serão detalhadas no item 2.1.5 dessa tese.

menor disposição de receptores específicos para insulina no tecido cerebral. Este quadro pode ser revertido por intervenção farmacológica, revertendo também o déficit cognitivo (revisto por FALCO et al., 2015).

A unidade neurovascular (NVU) é composta por células endoteliais cerebrais, pericitos ou células do músculo liso vascular, glia e neurônios, sendo responsável por controlar a permeabilidade da BHE e o fluxo sanguíneo cerebral, mantendo a composição química adequada do ambiente neuronal (ZLOKOVIC, 2011). Diversas alterações vasculares já foram relatadas como comuns na DA, tais como a diminuição na densidade da microvasculatura, espessamento da membrana basal, alterações endoteliais, alterações inflamatórias vasculares com presença de placas ateroscleróticas, além da angiopatia amiloide (FROTA et al., 2016). Segundo alguns pesquisadores, a DA pode ser iniciada por disfunções vasculares que precedem e promovem o processo neurodegenerativo. Dessa forma, os pacientes com DA apresentam riscos aumentados de acidente vascular cerebral (AVC) hemorrágico ou isquêmico (ZLOKOVIC, 2011; CANOBBIO et al., 2015).

Dentre os principais fatores de risco para DA encontram-se a hipertensão, diabetes e a obesidade, que são condições relacionadas a problemas vasculares e metabolismo da glicose (FROTA et al., 2016). Além disso, uma das isoformas do gene que leva a uma maior probabilidade de chance de desenvolvimento da forma esporádica do Alzheimer é o *APOE*³, responsável pelo transporte de lipídios e colesterol no cérebro (YAMAZAKI et al., 2019).

Considerando as informações acima, acredita-se que síndromes metabólicas, apresentam uma participação significativa no surgimento e / ou desenvolvimento do Alzheimer.

2.1.1.3 Hipótese da neuroinflamação

O processo de neuroinflamação surge como uma tentativa do organismo de resolver ou delimitar o quadro patológico no local, porém, quando desregulado, acaba levando a um agravamento no cenário, podendo resultar em uma inflamação crônica (WYSS-CORAY; ROGERS, 2012; KLOSKE; WILCOCK, 2020). Sabe-se que peptídeos β A, podem ativar a resposta inflamatória através de diferentes mecanismos

³ Abordado com detalhes no item 2.1.5 dessa tese.

(WEBSTER et al., 1997; MCGEER et al., 2016; STROOPER, DE; KARRAN, 2016). Já foi relatado que pacientes com comprometimento cognitivo leve (CCL) apresentam alterações inflamatórias, o que sugere que a ativação do sistema imunológico precede a deposição de β A (TARKOWSKI, 2003; BROSSERON et al., 2014). Recentemente, diversos genes ligados ao sistema imunológico foram associados a DA, corroborando a importância e envolvimento da neuroinflamação na doença (LAMBERT et al., 2013; KARCH; GOATE, 2015).

Nesse sentido, essa hipótese propõe a neuroinflamação como a causa da, embora ainda não se sabe ao certo se de fato é a causa ou consequência dessa patologia, embora, sem dúvida, tal processo certamente contribui bastante para o surgimento e a progressão da DA (KLOSKE; WILCOCK, 2020).

2.1.1.3.1 O sistema complemento

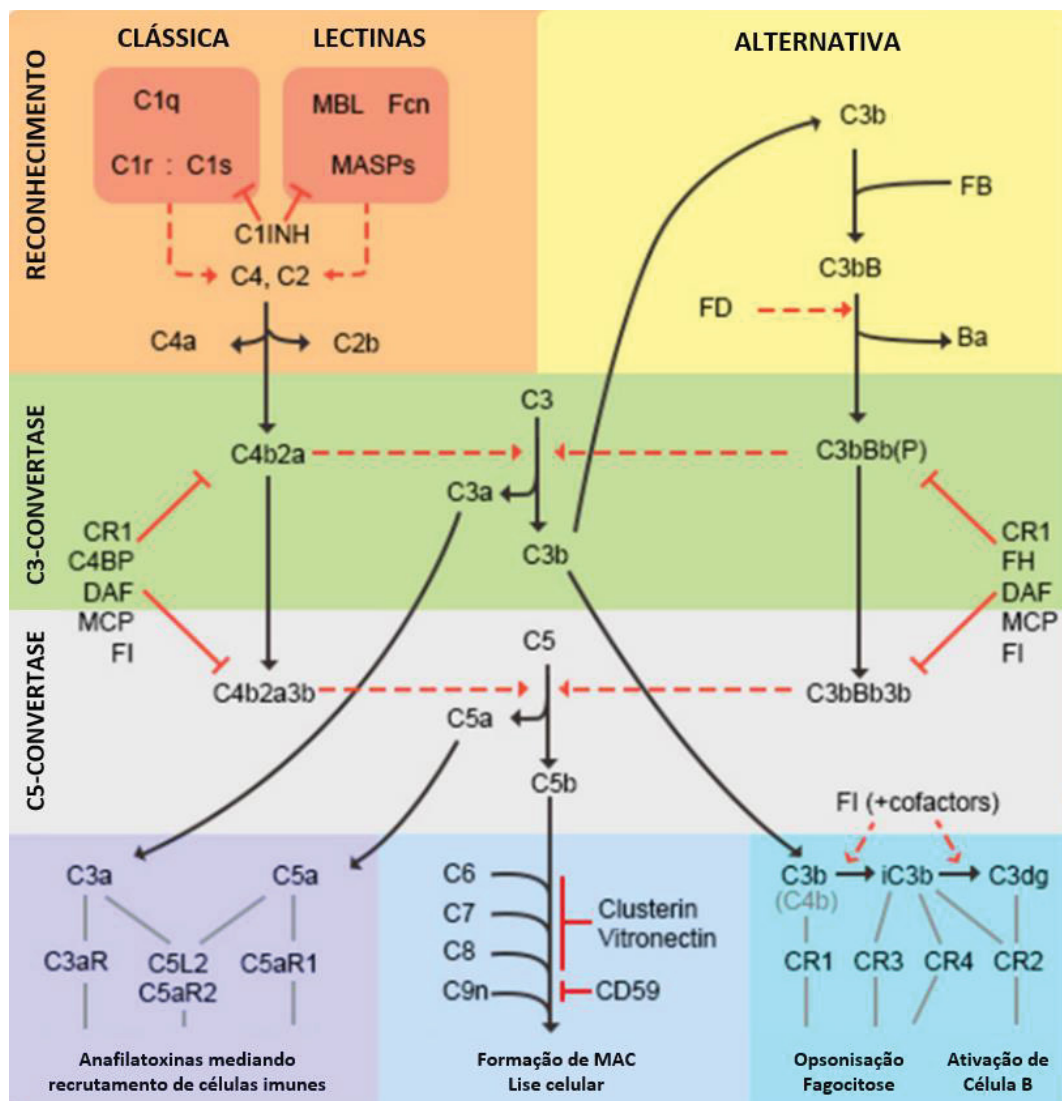
O sistema complemento (SC) é parte da imunidade inata, sendo considerado peça chave na defesa do organismo contra infecções e danos, desempenhando um importante papel na homeostase do organismo e proteção do sistema nervoso central (SNC) (RICKLIN et al., 2010; MERLE et al., 2015; LEE et al., 2019). Tal sistema consiste em uma cascata enzimática com a participação de mais de 50 proteínas e glicoproteínas circulantes, assim como receptores e reguladores solúveis ou de membrana (LEE et al., 2019). Estes podem desempenhar variadas funções, tais como: detectar e eliminar corpos estranhos, remover complexos imunes e restos celulares, estabelecer uma conexão entre as respostas imune inata e adaptativa (DUNKELBERGER; SONG, 2010; RICKLIN et al., 2016; GIALELI et al., 2018).

A ativação do SC resulta em uma cascata proteolítica, que pode ocorrer através de três vias distintas: clássica, das lectinas e alternativa. A ativação da via clássica pode ocorrer pela interação do componente C1q com complexos imunes (antígeno-anticorpo) ou moléculas não-imunes (polissacarídeos bacterianos, DNA, RNA, fungos e vírus, entre outros). São participantes dessa via: complexo de reconhecimento C1q, associado às serina proteases C1r e C1s; os componentes C4, C2 e C3, além dos componentes C5-C9 necessários à formação do complexo final de ataque à membrana (MAC). Na via alternativa, a ativação pode ocorrer pela interação direta com a superfície de células microbianas, entre outras substâncias biológicas, levando a hidrólise de C3 (que também pode ser espontânea) e deposição dos

fragmentos de C3 sobre a célula-alvo. Nessa via participam: C3, fator B (FB); fator D (FD) e properdina (P), que após uma cascata de reações levarão à formação do MAC. A via das lectinas é ativada pela ligação da lectina ligante de manose (MBL), ficolinas (FCN 1, 2 ou 3) ou colectina 11 (COLEC11) a resíduos específicos de carboidratos ou resíduos acetilados, presentes na superfície do patógeno ou de células alteradas, resultando na autoativação de MASP-1 e à transativação de MASP-2, levando a ativação de C4 e C2, formação de C3 convertase e MAC (DUNKELBERGER; SONG, 2010; RICKLIN et al., 2010, 2016; MERLE et al., 2015; LEE et al., 2019) (FIGURA 3). É importante ressaltar que a ativação da cascata do complemento pode resultar no recrutamento de células inflamatórias, fagocitose e lise celular, e a sua desregulação pode levar ao ataque das células próprias, gerando dano tecidual e doenças inflamatórias crônicas (RICKLIN et al., 2016).

Sabe-se que as placas β A são potentes ativadores do sistema complemento, o qual já se mostrou completamente ativado na DA, levando a produção de anafilatoxinas e promovendo um quadro maior de inflamação (MCGEER et al., 2016). Além disso, diversas moléculas do SC já apresentaram polimorfismos associados com a DA, tais como o receptor 1 do complemento (CR1, também conhecido como CD35) (LAMBERT et al., 2009), clusterina (CLU) (LAMBERT et al., 2009), C3a e seu receptor C3aR (LIAN et al., 2015; LITVINCHUK et al., 2018), C5a e seu receptor (C5aR) (AN et al., 2018) e C1q (MCGEER et al., 2016; LIAN et al., 2016; DEJANOVIC et al., 2018).

FIGURA 3 - VIAS DE ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO.

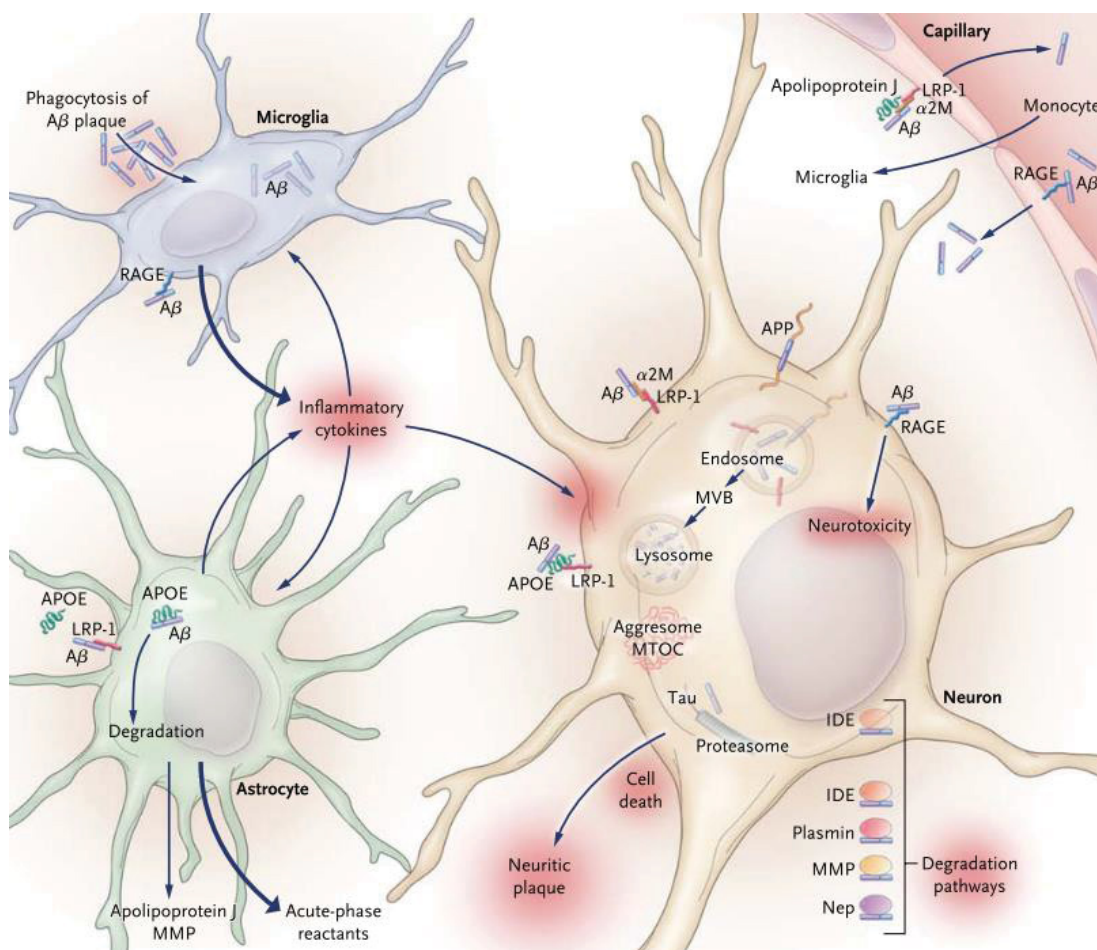


LEGENDA: Em vermelho claro, fase de iniciação das vias clássica e das lectinas, ambas inibidas pelo inibidor de C1 (C1inh). Em amarelo, fase de iniciação da via alternativa. Em verde, formação e ação enzimática das C3 convertases resultantes das três vias (idêntica para as vias clássica e das lectinas). Em cinza-claro: formação e ação enzimática das C5 convertases. Em cinza-escuro: ação das anafilatoxinas C3a e C5a. Em azul-claro: formação do complexo de ataque a membrana (MAC). Em azul: ação de C3b e seus subprodutos. Flecha vermelha obtusa: inibição (característica para cada fase e via representada). Flecha vermelha tracejada: ação enzimática sobre um substrato. Linhas pretas: unem passos da cascata proteolítica. Linhas cinza: reconhecimento de receptor e ligante. CR – receptor de complemento, C4BP - proteína ligante de C4, FH – fator H, FI – fator I, DAF – fator de aceleração de decaimento, MBL – lectina ligante de manose, FCN – ficolina, MASPs – serina proteases associadas a MBL, MCP - proteína cofatora de membrana. FONTE: Adaptado de CARPANINI et al., 2019.

2.1.1.3.2 Células envolvidas no processo de neuroinflamação na DA

Os protagonistas na produção de mediadores inflamatórios no cérebro são a micróglia e os astrócitos, que podem liberar citocinas pró ou anti-inflamatórias, dependendo do estímulo recebido, além de componentes do sistema complemento (FIGURA 4) (HENEKA et al., 2015; STROOPER, DE; KARRAN, 2016; WHITTINGTON et al., 2017; KLOSKE; WILCOCK, 2020).

FIGURA 4 - MECANISMOS DE REMOÇÃO DE PLACAS β A E ATIVAÇÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO



NOTA: Embora a figura represente a neuroinflamação de modo superficial, é possível compreender o papel das células da glia, na depuração das placas. O peptídeo β-amilóide (βA) é formado dentro de compartimentos intracelulares (o retículo endoplasmático, aparelho de Golgi e endossomas) ou pode entrar em vários tipos de células através da proteína relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade. A apolipoproteína E (APOE) e α2- macroglobulinas (α2M) são acompanhantes nesse processo na gênese das placas extracelulares. A micróglia pode fagocitar as βA. Os astrócitos também participam da eliminação de βA por meio da internalização mediada por receptores e facilitam a transferência de βA para fora do SNC através da circulação. Micróglia e astrócitos são recrutados e estimulados na DA para liberar citocinas pró-inflamatórias e reagentes de fase aguda. Receptores para moléculas de produtos finais de glicação avançada (RAGE) transduzem efeitos

tóxicos e inflamatórios do β A extracelular e medeiam o influxo de β A vascular. O meio inflamatório provoca alterações neuríticas e quebra da barreira hematoencefálica. Além das reações mediadas por células, a depuração de β A ocorre por meio de proteólise enzimática, principalmente por meio da neprilisina (Nep) e da enzima degradante da insulina (IDE). Os oligômeros β A bloqueiam a função do proteassoma, facilitando o acúmulo de tau intracelular e o acúmulo de β A em "agrossomos". FONTE: QUERFURTH & LAFERLA, 2010

A micróglia desempenha um dos principais papéis dentro da neuroinflamação, sendo responsável por detectar e remover fatores externos ao cérebro (padrões moleculares associados a danos ou DAMPs e a patógenos ou PAMPs), estabelecendo a homeostase do ambiente (WYSS-CORAY; ROGERS, 2012). Na DA, a micróglia reconhece as placas β A através de seus receptores, tornando-se ativas e circundando-as, a fim de formar uma barreira ao mesmo tempo em que as fagocitam. Com um acúmulo de β A intracelular, pode ocorrer a morte celular, resultando no recrutamento de mais micróglia para a região e aumentando o processo inflamatório, seja pelo acúmulo de células ou pela liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral α (TNF α), interleucina 1 β (IL-1 β), entre outros que podem levar a danos teciduais, como quimiocinas, proteínas do complemento e óxido nítrico (CZIRR; WYSS-CORAY, 2012; KLOSKE; WILCOCK, 2020).

Aparentemente, nos estágios iniciais da DA, a micróglia possui os receptores para o reconhecimento de β A, assim como as enzimas necessárias para seu processamento. No entanto, com o avanço da doença, os receptores e enzimas de degradação são significativamente reduzidos. Este processo decorre de uma resposta ao aumento de citocinas inflamatórias (BOLMONT et al., 2008; HICKMAN et al., 2008). Todo esse processo de ativação, fagocitose e recrutamento de novas células, pode resultar na formação de inflamassomas, aumentando ainda mais a expressão de citocinas inflamatórias e deposição de placas β A (YIN et al., 2016; KLOSKE; WILCOCK, 2020).

Em um cérebro saudável, os astrócitos são responsáveis pela manutenção de nutrientes e de um ambiente favorável para os neurônios, secretando e reciclando neuro transmissores, proporcionando a homeostase de íons (como por exemplo, os níveis de cálcio e potássio), regulando mecanismos energéticos, remodelando sinapses e modulando o estresse oxidativo (WYSS-CORAY; ROGERS, 2012; HAMPEL et al., 2020; KLOSKE; WILCOCK, 2020). Na DA, essas células são ativadas, perdendo sua capacidade de entrega de nutrientes e passando a liberar citocinas, aumentando a toxicidade neuronal. Além disso, estudos recentes sugerem que a

micróglia, quando ativada, pode ativar os astrócitos, retroalimentando um ciclo prejudicial de neuroinflamação (LIDDELOW et al., 2017).

Além da micróglia e dos astrócitos, outras células do SNC podem participar do processo de neuroinflamação. Oligodendrócitos são responsáveis pela formação da bainha de mielina no SNC, sendo críticos para a velocidade da neurotransmissão. Sabe-se que oligodendrócitos podem ser alvos de respostas imunes, como já observado no caso da esclerose múltipla (WYSS-CORAY; ROGERS, 2012). Além disso, sabe-se que tais células são imunorreativas a componentes do sistema complemento (C1q, C1s, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8 e C9), sugerindo que essas podem ser fontes primárias para níveis significativamente aumentados de complemento em regiões patologicamente vulneráveis do cérebro com DA (HOSOKAWA et al., 2003).

Embora não haja muitos trabalhos focando no papel dos neurônios na neuroinflamação, esses também são sugeridos como envolvidos nesse processo, levando a um aumento na expressão e consequente produção de moléculas pró-inflamatórias. Isto exacerbaria as reações locais, resultando em sua própria destruição (AHMAD et al., 2019).

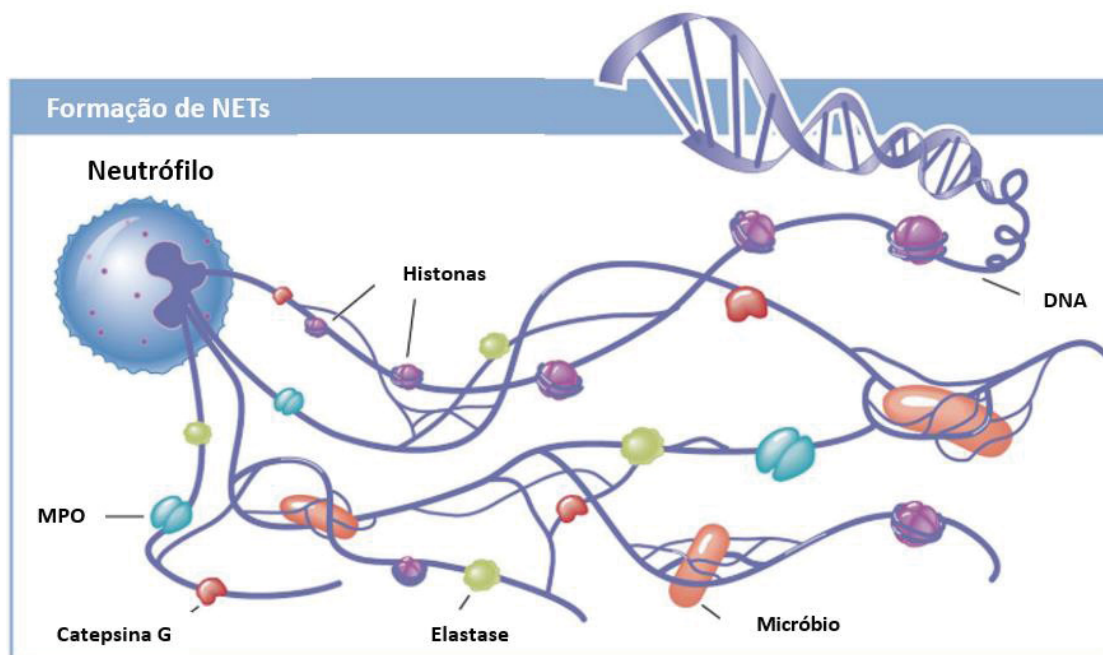
Além disso, atualmente sabe-se que embora o SNC tenha sido até então, considerado um local imunologicamente privilegiado e relativamente isolado, a inflamação periférica pode exacerbar o ambiente inflamatório do cérebro e contribuir para a neuroinflamação crônica e neurodegeneração (CZIRR; WYSS-CORAY, 2012; WHITTINGTON et al., 2017). Dessa maneira, células e componentes do processo inflamatório periférico, podem desempenhar papéis importantes no desenvolvimento da neurodegeneração.

2.1.1.3.3 Formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs)

Neutrófilos correspondem a cerca de 70% dos leucócitos disponíveis no sangue e fazem parte da primeira linha de defesa do organismo contra a invasão de patógenos, além de serem capazes de reconhecer DAMPs e PAMPs (DONG et al., 2018; BONT, DE et al., 2019). Dessa maneira, são importantes mediadores da inflamação e podem ser recrutados para o local da inflamação por citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, além de moléculas do sistema complemento (ZENARO et al., 2015; BONT, DE et al., 2019).

Como mecanismo de defesa podem desenvolver estratégias distintas, incluindo fagocitose, degranulação, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), e a extrusão de NETs, que pode levar à morte celular por NETose (DONG et al., 2018). A formação de armadilhas extracelulares pelos neutrófilos (NETs – do inglês *neutrophil extracellular traps*) acarreta em mudanças dramáticas na morfologia celular, levando a extrusão da cromatina descondensada no ambiente extracelular, formando estruturas em forma de rede, decoradas com histonas citrulinadas e proteínas granulares de ação antimicrobica, tais como elastase neutrofílica (NE), mieloperoxidase (MPO), proteinase 3, catepsina G, lactoferrina, metaloproteinase 9 de matriz (MMP-9), proteínas de reconhecimento de peptidoglicano, pentraxina e LL-37 (FIGURA 5), que levam a contenção do patógeno no local, assim como a sua destruição (PIETRONIGRO et al., 2017; BONT, DE et al., 2019). De maneira geral, a formação de NETs é letal para os neutrófilos, porém recentemente tem sido descrito a formação de NETs pela via “vital”, que se utiliza do material genético das mitocôndrias para a formação das NETs, aumentando a sobrevivência dos neutrófilos (BONT, DE et al., 2019).

FIGURA 5 - FORMAÇÃO DAS NETS.



NOTA: a imagem representa o extravasamento da cromatina do interior do núcleo do neutrófilo, contendo histonas, mieloperoxidase (MPO), catepsina G, elastase, enredando o patógeno e facilitando a sua destruição. FONTE: Adaptado de MIYATA & FAN, 2012.

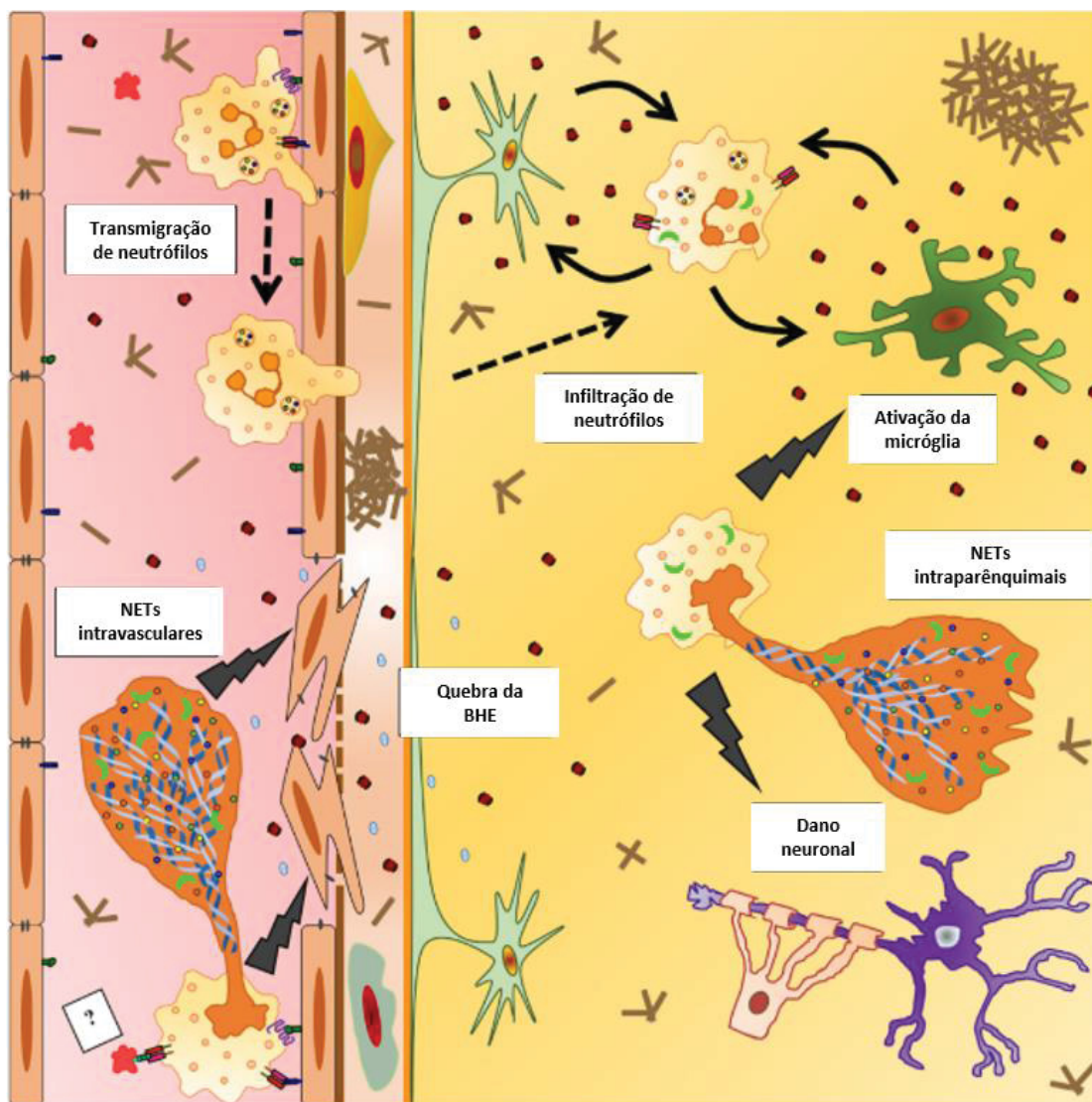
As NETs são degradadas por DNases presentes no plasma e na sequência, eliminadas pelos macrófagos. A resolução das NETs é de extrema importância, visto que podem resultar em um quadro inflamatório crônico e oclusão de vasos sanguíneos, gerando danos teciduais e surgimento de doenças autoimunes (BONT, DE et al., 2019).

2.1.1.3.4 NETs no Alzheimer

O cérebro é protegido pela BHE, que evita com eficiência a infiltração de células imunes circulantes e minimiza o influxo de proteínas plasmáticas do sangue (VEERHUIS et al., 2011) Apesar disso, pacientes e modelos de DA apresentam neutrófilos em vasos sanguíneos e no parênquima cerebral (BAIK et al., 2014; ZENARO et al., 2015), o que possivelmente decorre da disfunção da integridade da BHE, já relatada na DA (revisto por PIETRONIGRO et al., 2017). Recentemente, Zenaro e colaboradores (2015) identificaram a presença de NETs no cérebro de pacientes com DA e modelo animal de Alzheimer. Posteriormente, Dong e colaboradores (2018) relataram a presença de NETs no soro de pacientes com DA.

As placas β A podem ser reconhecidas como DAMPs, levando a ativação de células gliais, tais como a micróglia e astrócitos, resultando na liberação de citocinas pró-inflamatórias e moléculas do complemento, com posterior recrutamento de neutrófilos (BAIK et al., 2014; PIETRONIGRO et al., 2017; BONT, DE et al., 2019). Além disso, existem indícios de que o reconhecimento das placas β A como DAMPs induz a expressão de moléculas de adesão endotelial, incluindo ICAM-1 em células endoteliais do cérebro, sugerindo que β A pode desempenhar um papel na ativação endotelial e na adesão intravascular de neutrófilos na DA (revisto por PIETRONIGRO et al., 2017). Quando no parênquima cerebral, os neutrófilos são ativados por mediadores inflamatórios potencialmente liberados pelas células gliais e produzem NETs. Estas podem ativar ainda mais as células gliais e danificar os neurônios circundantes (FIGURA 6) (revisto por PIETRONIGRO et al., 2017).

FIGURA 6 - POSSÍVEIS EFEITOS DA PRODUÇÃO DE NETs NA DA.



NOTA: As placas β A e outros DAMPs, assim como fatores pró-inflamatórios levam à ativação das células endoteliais cerebrais, induzindo a suprarregulação de moléculas de adesão e quimioatraentes nessas células. Isso permite a aderência de neutrófilos circulantes a células endoteliais, por meio da ligação entre o antígeno associado a função linfocitária (LFA-1) β 2 integrina a molécula 1 de adesão intercelular (ICAM-1) e seu extravasamento para o cérebro. Os quimioatraentes na superfície do endotélio podem ativar as integrinas β 2 via sinalização por receptores de sete passagens transmembrana acoplados à proteína G (GPCRs). Os neutrófilos que aderem à parede do vaso produzem NETs intravasculares, potencialmente com a contribuição de plaquetas ativadas, provavelmente através da ligação entre o receptor LFA-1 do neutrófilo e os receptores ICAM-2 das plaquetas. A formação de NETs induz a produção de citocinas pró-inflamatórias e trombina, contribuindo para a perda da integridade da barreira hematoencefálica. Os neutrófilos no parênquima cerebral são ativados por mediadores inflamatórios potencialmente liberados pelas células gliais e produzem NETs, que podem ativar ainda mais as células gliais e danificar os neurônios circundantes.

FONTE: Adaptado de PIETRONIGRO et al., 2017

Embora não tenha sido muito explorado até então na DA, sabe-se que o sistema complemento pode estar intimamente relacionado com o recrutamento de neutrófilos e formação das NETs. Segundo a revisão feita por Bont et al. (2019), as proteínas do sistema complemento, quando ativadas, podem estimular a formação das NETs, e estas por sua vez, podem servir de plataforma de ativação para o sistema complemento, intensificando a resposta inflamatória. Alguns estudos demonstraram que há uma sinergia na sinalização entre C5a-C5aR1 e receptores semelhantes a Toll (TLR), levando a ativação de fagócitos na periferia, exacerbando a resposta pró-inflamatória e a produção de níveis prejudiciais de citocinas inflamatórias (revisto por TENNER et al., 2018). Além disso, quando os neutrófilos são ativados por C5a, a indução de formação de NETs é exacerbada (BONT, DE et al., 2019). Em um trabalho realizado com o intuito de avaliar a influência do sistema complemento na formação de NETs em resposta a bactérias, verificou-se que a opsonização promovida pelo complemento não apenas induz a fagocitose, mas também promove a liberação de NETs. Neste processo, CR1 aparentemente desempenha um papel dominante, pois um antagonista de CR1 não apenas impediu a detecção das partículas opsonizadas por C3b, como também foi associado a um decréscimo na concentração de NETs (PALMER et al., 2016). Além disso, foi observado que o CR1 presente na membrana de neutrófilos, quando ligado a C3b fixada a IgG, induz a alteração nos eventos de transdução de sinal ligados a receptores Fc, levando a liberação de mieloperoxidase e geração de ácido hipocloroso (SAMBANDAM; CHATHAM, 1998), o que poderia possivelmente levar preferencialmente a formação das NETs, ao invés da fagocitose. Sabe-se que polimorfismos de *CR1* estão associados com a DA (LAMBERT et al., 2009). Considerando a presença de NETs na DA, uma investigação da relação entre CR1 e NETs pode ser esclarecedora.

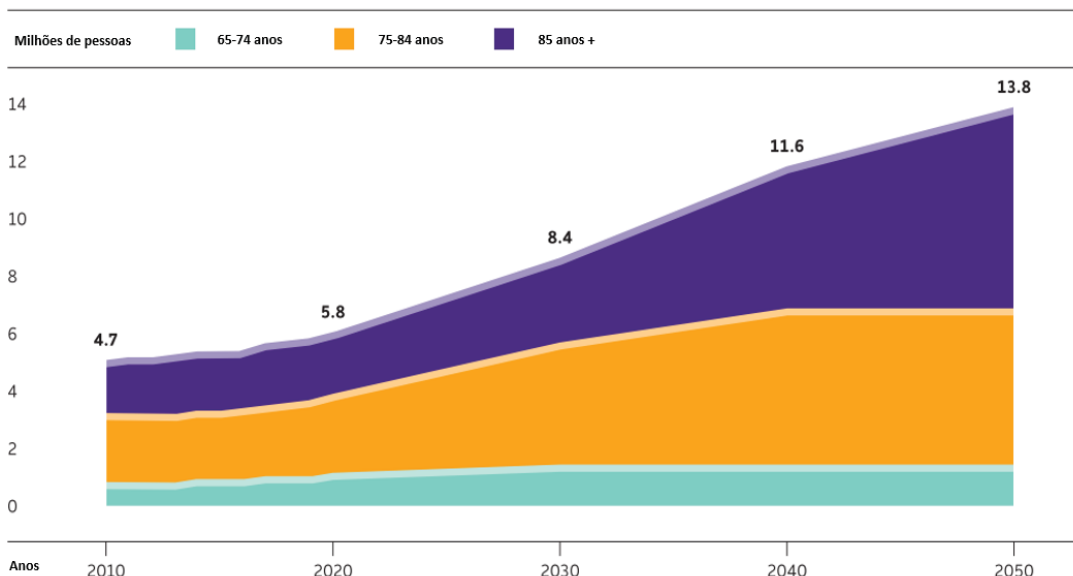
Sabe-se que as NETs precisam ser degradadas pelas DNases para evitar o contínuo estímulo inflamatório e dano tecidual. Curiosamente, há um relato clínico de um paciente de DA em estágio avançado, que foi tratado com DNase I e teve uma melhora cognitiva (TETZ; TETZ, 2016). Uma das hipóteses levantadas é que a DNase I tenha agido dissolvendo as NETs presentes no cérebro, reduzindo o quadro inflamatório, porém são necessários mais estudos investigativos quanto ao papel da DNase I na DA e sua relação com as NETs, para corroborar essa hipótese (SMALHEISER, 2019).

2.1.2 Epidemiologia

Com o aumento da expectativa de vida da população, estima-se que demências associadas à idade aumentem cerca de 225% em número, de 2010 a 2050 (FIGURA 7) (PRINCE et al., 2013; HEBERT et al., 2013). Os custos da demência para a sociedade são muito elevados, sendo estimados em 1 trilhão de dólares, globalmente (INTERNATIONAL, 2019). A DA é a causa mais comum de demência, sendo responsável por 60 a 80% dos casos (ALZHEIMER'S-ASSOCIATION, 2020). Atualmente, nos Estados Unidos (EUA) há cerca de 5,8 milhões de casos (FIGURA 8), sendo que a estimativa é que até 2050 a prevalência da DA em pessoas acima de 65 anos alcance 13,8 milhões, apenas nos EUA (ALZHEIMER'S-ASSOCIATION, 2020). Embora os dados para o Brasil sejam escassos, a prevalência de DA e outras demências até 2016 foi de 1.691.024 de casos (NICHOLS et al., 2019). Além disso, a incidência de casos aumenta dramaticamente com o aumento da idade, podendo ser de 0,4% em pessoas com 65 a 74 anos, 3,2% em pessoas de 75 a 84 anos, e 7,6% em pessoas com 85 anos ou mais (baseados em dados de 2011) (ALZHEIMER'S-ASSOCIATION, 2020).

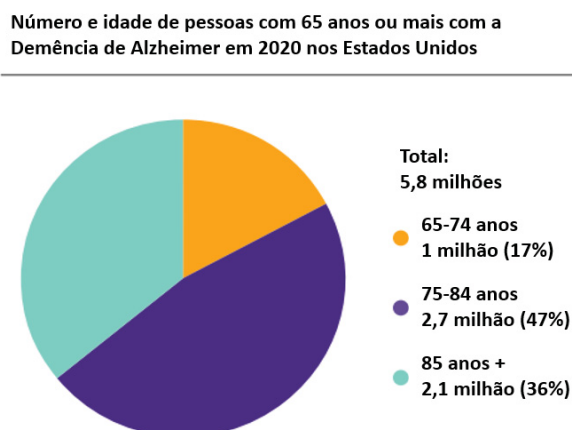
FIGURA 7 - PERSPECTIVA DE NÚMERO DE CASOS DE DOENÇA DE ALZHEIMER NOS ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA (USA) ATÉ 2050.

Projeção do número de pessoas com 65 anos ou mais na população do Estados Unidos com Demência de Alzheimer de 2010 a 2050.



FONTE: Adaptado de ALZHEIMER'S-ASSOCIATION, 2020.

FIGURA 8 - PERCENTUAL DE AFETADOS PELA DA POR FAIXA ETÁRIA EM 2020 NOS USA.



FONTE: Adaptado de ALZHEIMER'S-ASSOCIATION, 2020.

Existe uma disparidade de pesquisas com DA entre populações humanas, sendo que que grande parte é realizada com a população europeia ou asiática, sendo que grupos como negros / Afro-americanos , Hispânicos / Latinos, Asiático-Americanos / Ilhas do Pacífico e Nativos Americanos, são sub-representados, o que dificulta determinar se a DA apresenta uma incidência maior em determinado grupo (ALZHEIMER'S-ASSOCIATION, 2020).

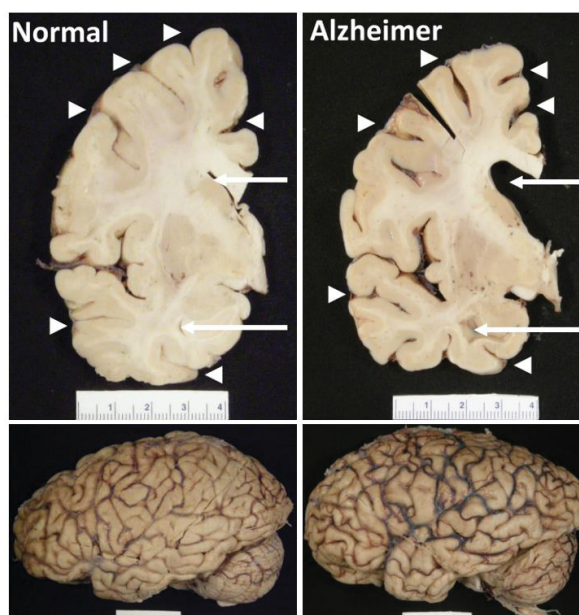
A DA apresenta uma clara diferença de incidência e prevalência entre os sexos, sendo duas vezes mais frequentes em mulheres (2:1 mulheres / homens). De maneira geral, homens e mulheres apresentam diferença nos sintomas, sendo que mulheres apresentam um declínio cognitivo e uma atrofia cerebral mais rápida após o primeiro diagnóstico, o que pode ser parcialmente explicado por diferenças específicas da morfologia cerebral entre os sexos, além das alterações hormonais pós-menopausa (MIGLIORE; COPPEDÈ, 2009; FERRETTI et al., 2018).

2.1.3 Fisiopatologia

Anatomicamente, a DA é caracterizada por uma atrofia cortical, particularmente no lobo temporal e na formação hipocampal, resultando em um aumento nos sulcos e fissuras corticais, com a consequente redução dos giros (FIGURA 9). Inicialmente, as áreas mais prejudicadas são as corticais límbicas, paralímbicas e do córtex de associação, com uma ligeira preservação dos córtices primários. Com essa distribuição do processo patológico, o quadro clínico inicial é

caracterizado pelas alterações cognitivas e comportamentais, levando a um comprometimento motor e sensorial apenas no estágio mais grave da doença (BRAAK; BRAAK, 1991; CARAMELLI; BARBOSA, 2002; WALSH; SELKOE, 2004; LANE et al., 2018; DETURE; DICKSON, 2019).

FIGURA 9 - COMPARAÇÃO ANATÔMICA ENTRE ENCEFALO DE PACIENTE COM DA E INDIVÍDUO SEM A PATOLOGIA



O encéfalo de um paciente com DA pode mostrar alargamento nos espaços dos sulcos e estreitamento dos giros em comparação com um cérebro normal. Isso pode ser mais facilmente observado em cortes coronais, conforme indicado pelas pontas de seta, e essa atrofia é frequentemente acompanhada pelo aumento dos chifres frontal e temporal dos ventrículos laterais, conforme destacado pelas setas maiores. FONTE: DETURE & DICKSON, 2019.

A DA apresenta dois tipos de lesões neuropatológicas: (1) a presença de placas βA localizadas na região extracelular, sendo essas derivadas da clivagem proteolítica da APP⁴; e (2) formação de ENFs na parte intracelular, resultantes de uma hiperfosforilação da proteína tau, levando a uma desestabilização dos microtúbulos, desorganização do citoesqueleto, entrega de nutrientes inadequada e consequente morte celular (BRAAK; BRAAK, 1991; BRETTSCHEIDER et al., 2015). Dessa maneira, ao observar microscopicamente a região cerebral afetada, observa-se uma redução nos números de neurônios e sinapses, possivelmente decorrente do acúmulo desses biomarcadores. As placas βA tendem a se acumular principalmente na região

⁴ O processo de formação das placas é comentado em detalhes no item 2.1.1.1 – Hipótese da cascata amiloide.

cortical, e em alguns núcleos subcorticais, e em torno de vasos sanguíneos, podendo ser difusas, neuríticas ou atroficas. Também podem ser observados micróglia e astrócitos reativos (DETURE; DICKSON, 2019).

Recentemente, observou-se que tanto $A\beta$, quanto a proteína tau, podem apresentar diferentes variantes conformacionais, levando a níveis variados de neurotoxicidade (BRETTSCHEIDER et al., 2015).

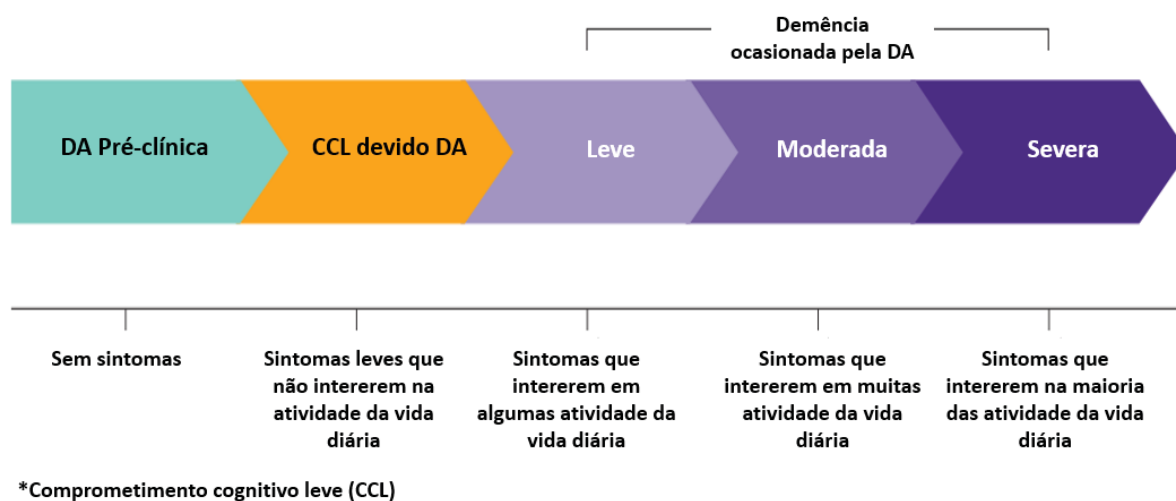
Embora sejam considerados biomarcadores de DA, as placas βA e ENFs não são exclusivos da doença, podendo ocorrer naturalmente durante o envelhecimento (porém em níveis muito menores) e em outras demências. Além disso, é importante ressaltar que os critérios neuropatológicos são os mesmos para as formas familiares e esporádicas de DA (FROTA et al., 2016).

2.1.4 Diagnóstico e tratamento

Anteriormente, o diagnóstico de DA só era confirmado após a análise da autópsia cerebral com a presença das placas βA e os ENFs, resultando em um longo período de incerteza para a pessoa e seus familiares. Cerca de 30% dos diagnósticos eram considerados falsos positivos (ALZHEIMER EUROPE, 2016).

Atualmente, há um novo modelo de diagnóstico, que considera o Alzheimer como um *continuum*, no qual a definição de DA foi estendida para abranger todo o espectro da doença, incluindo a pré-demência (DA pré-clínica e prodrômica ou comprometimento cognitivo leve (CCL, do inglês *Mild Cognitive Impairment* - MCI) devido à DA) até fases de demência, levando em consideração os biomarcadores da doença e o diagnóstico clínico. Dessa maneira, o diagnóstico pode ser estabelecido sem a necessidade de autópsias (FIGURA 10) (DUBOIS et al., 2010, 2015; ALZHEIMER EUROPE, 2016; ALZHEIMER'S-ASSOCIATION, 2020). Sendo assim, o termo DA abrange todo o espectro da doença, e o termo "Demência de Alzheimer", está relacionado apenas com um dos estágios presentes dentro do espectro (ASSOCIATION, 2017).

FIGURA 10 - DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE ALZHEIMER COMO UM CONTINUUM



FONTE: Adaptado de Alzheimer's Association, 2020.

Na fase pré-clínica, os pacientes apresentam alterações cerebrais mensuráveis que indicam os primeiros sinais da DA (níveis anormais de β A e diminuição do metabolismo da glicose), mas ainda não apresentam sintomas (como a perda de memória, por exemplo), pois o cérebro encontra mecanismos compensatórios. É importante ressaltar que nem todos os indivíduos com presença de biomarcadores da DA desenvolvem necessariamente CCL ou demência (ALZHEIMER'S-ASSOCIATION, 2020).

Já no estágio de CCL devido a DA, há evidências de alterações nos biomarcadores da doença e problemas sutis de cognição, tais como alterações de memória e pensamentos, sendo perceptíveis às pessoas próximas, mas não interferem na capacidade de realização de atividades cotidianas. Nesse estágio, o cérebro já não consegue compensar os danos resultantes da morte celular (DUBOIS et al., 2010, 2015; ALZHEIMER EUROPE, 2016; ALZHEIMER'S-ASSOCIATION, 2020).

O estágio de demência devido a DA pode ser subdividido em três sub categorias: leve, moderado e severo. A progressão por esses estágios, assim como os sintomas apresentado em cada um deles, varia de acordo com o paciente, mas de maneira geral essa fase é caracterizada pelos distúrbios perceptíveis de memória, julgamento e humor, levando a dificuldades de relacionamento e execução das funções da vida diária, somado a alterações nos biomarcadores da DA e morte celular

(DUBOIS et al., 2010, 2015; ALZHEIMER EUROPE, 2016; ALZHEIMER'S-ASSOCIATION, 2020).

Para o diagnóstico de DA, não há apenas um teste ou exame em específico, mas sim um conjunto de ferramentas, que envolvem histórico familiar e anamnese detalhada, testes cognitivos, exames físicos, bioquímicos genéticos e neurológicos associados a diagnóstico por imagem, a fim inclusive de excluir outras possíveis doenças que possam levar ao quadro demencial (ASSOCIATION, 2017).

De maneira geral, são considerados os estágios determinados na escala de Braak (BRAAK; BRAAK, 1991), correlacionando os sintomas clínicos de demência com a distribuição dos ENFs no cérebro (FALCO et al., 2015). Nessa escala, os estágios são definidos como I e II quando há presença de ENFs principalmente na região transentorrinal, levando a níveis de cognição normais ou levemente afetadas; III e IV quando há presença de ENFs também nas regiões límbicas, resultando em prejuízos cognitivos leves a moderado (III - confusão e perda de memória, problemas com tarefas cotidianas, mudanças na personalidade e na capacidade de julgamento; IV - sintomas psicóticos como ansiedade, desconfiança e agitação, além de distúrbios do sono); sendo que nos últimos estágios (V e VI), já há um grande comprometimento neocortical, comprometendo a fala, controle da bexiga e intestino, dificuldade de reconhecimento de familiares e perda de apetite (FALCO et al., 2015).

Como testes cognitivos, geralmente é utilizado como teste de rastreio o Mini-Exame do Estado Mental (MEEM) (ANEXO 1) (FOLSTEIN et al., 1975), em conjunto com escalas que avaliam o desempenho funcional na vida diária, tais como PFEFFER (PFEFFER et al., 1982) (ANEXO 2) e o Índice de Katz (KATZ, 1963). Para avaliar o grau de demência, normalmente utiliza-se o CDR (Avaliação Clínica de Demência) (ANEXO 3), em conjunto com a Escala de Depressão Geriátrica (GDS) (ANEXO 4), a fim de realizar um diagnóstico diferencial de depressão, demência e outros possíveis transtornos psiquiátricos.

A DA ainda é uma patologia sem cura. Dessa forma, nenhum dos cinco fármacos disponíveis para o tratamento, consegue retardar ou parar os danos ocasionados pela destruição neuronal, funcionando apenas de maneira paliativa, melhorando os sintomas temporariamente, mas com diversos efeitos colaterais (ASSOCIATION, 2017; DU et al., 2018).

Os medicamentos aprovados para uso no tratamento de DA pela FDA (do inglês *Food and Drug Administration*) atualmente são: Donepezil, Rivastigmina,

Galantamina, Memantina e Namzaric® (uma combinação de Donepezil e Memantina de liberação prolongada). Os três primeiros são anticolinesterásicos que inibem a colinesterase na fenda sináptica, diminuindo sua degradação, e tornando esse neurotransmissor, disponível por mais tempo. Essa abordagem é utilizada, para balancear a perda de grande parte dos neurônios colinérgicos. Já a Memantina é um antagonista dos receptores glutamatérgicos NMDA. Acredita-se que esses receptores desempenhem um papel importante na neurodegeneração, visto que são receptores de glutamato, um neurotransmissor excitatório envolvido com a memória e o aprendizado. Quando há uma ligação excessiva de glutamato aos NMDARs, ocorre um excesso de influxo de Ca^{2+} , levando a excitotoxicidade, perda sináptica e morte neuronal (DU et al., 2018; ALZHEIMER'S-ASSOCIATION, 2020; ABEYSINGHE et al., 2020).

2.1.5 Genética

A DA pode ser classificada em duas categorias: familiar e de início precoce (fAD ou EOAD, do inglês *Early-onset Alzheimer's disease*), ou esporádica e de início tardio (LOAD do inglês *Late-onset Alzheimer's disease*) (revisto por GROSSMAN et al., 2010). Os dois subconjuntos compartilham características patológicas comuns e são considerados altamente hereditários, sendo estimado entre 90-100% de herdabilidade para fAD e de 60 a 80% para LOAD (NEUNER et al., 2020). A fAD inicia antes dos 60 anos e representa cerca de 1% dos casos de DA (revisto por GROSSMAN et al., 2010). Pode ser resultante de diversas mutações localizadas nos genes que codificam proteínas envolvidas na hipótese da cascata amiloide: *APP* (*proteína precursora amiloide*), *PSEN1* (*presenilina 1*) e *PSEN2* (*presenilina 2*), sendo herdadas de forma autossômica dominante (SMITH, 1999). No entanto, grande parte dos pacientes com fAD não carregam nenhuma dessas três mutações, destacando a necessidade de pesquisas para encontrar outros genes causais, com modo de herança semelhante (GROSSMAN et al., 2010; THONBERG et al., 2017; CARMONA et al., 2018; LANE et al., 2018).

A LOAD corresponde a maior parte dos casos de DA e acomete indivíduos a partir dos 65 anos (HOLLINGWORTH; HAROLD; JONES; et al., 2011). Trata-se de

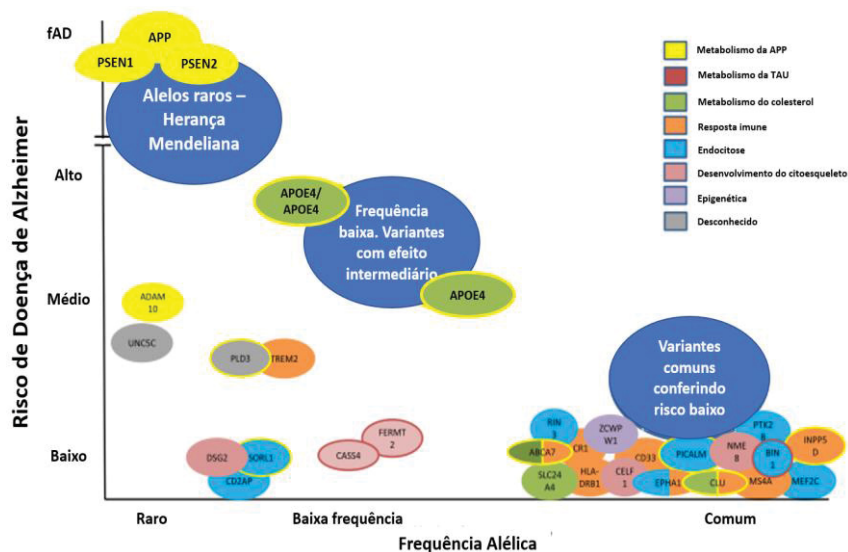
uma doença complexa, na qual há influência genética e de fatores ambientais⁵. Nesse caso, diversos polimorfismos gênicos distribuídos em variados genes, podem somar seus efeitos, contribuindo para o aumento de susceptibilidade a DA, caracterizando um escore de risco poligênico (ter o alelo mutado não significa necessariamente o desenvolvimento da doença, mas a soma do efeito desses podem aumentar gradativamente a susceptibilidade a doença) (FIGURA 11 e 12)⁶. Nesse sentido, existem diversos trabalhos que buscam um modelo matemático robusto para a predição do escore poligênico em DA. Uma dessas abordagens demonstrou uma precisão de predição de 75–84% do risco de DA, considerando o gene *APOE* dentre as variantes analisadas, adicionalmente ao sexo e idade como preditores (ESCOTT-PRICE et al., 2017; LEONENKO et al., 2019). Para esse tipo de análise, é considerado o valor de área sob a curva (AUC), que é uma estabelecida em um gráfico a fim de determinar os falsos positivos e negativos, ou seja, qual a força do modelo em predizer o risco genético, identificando corretamente casos como casos e controles como controles. Um AUC de 1, indica que o modelo estará sempre correto e de 0,5 indica que é uma predição aleatória. Para a DA, os valores de AUC são em torno de 0,82, dependendo do painel (BLAUWENDRAAT et al., 2020).

São mais de 30 loci de susceptibilidade a DA identificados em estudos de associação de genoma total (GWAS, do inglês *Genome-wide Association Study*) (LEONENKO et al., 2019), realizados principalmente em populações europeias e asiáticas, e grande parte delas ainda não possuem razão esclarecida, dentro da fisiopatologia da doença.

⁵ Os fatores ambientais que podem contribuir na etiologia da doença foram comentados no tópico 2.1.1.

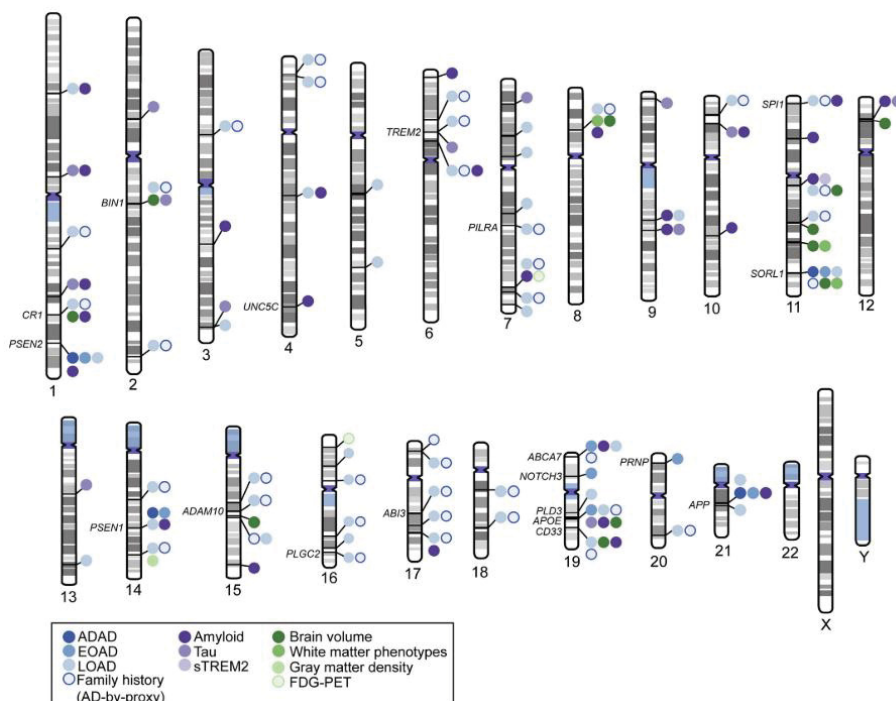
⁶ Embora haja diversos genes associados com LOAD, nessa tese focamos principalmente em genes envolvidos na neuroinflamação ou regulação epigenética. Como o *CR1* foi investigado com maior profundidade nesse trabalho, informações sobre este gene encontram-se detalhadas no sub item 2.1.5.1.

FIGURA 11 - GENES ASSOCIADOS COM A DA E SUA RELAÇÃO DE RISCO NA DOENÇA



NOTA: A cor interna corresponde à sua função. Onde há duas cores internas, o gene foi implicado em mais de uma via. Acredita-se que os genes circulado em amarelo também influenciam o metabolismo da proteína precursora da amiloide; os genes circulado em vermelho influenciam o metabolismo da tau. FONTE: LANE et al., 2018.

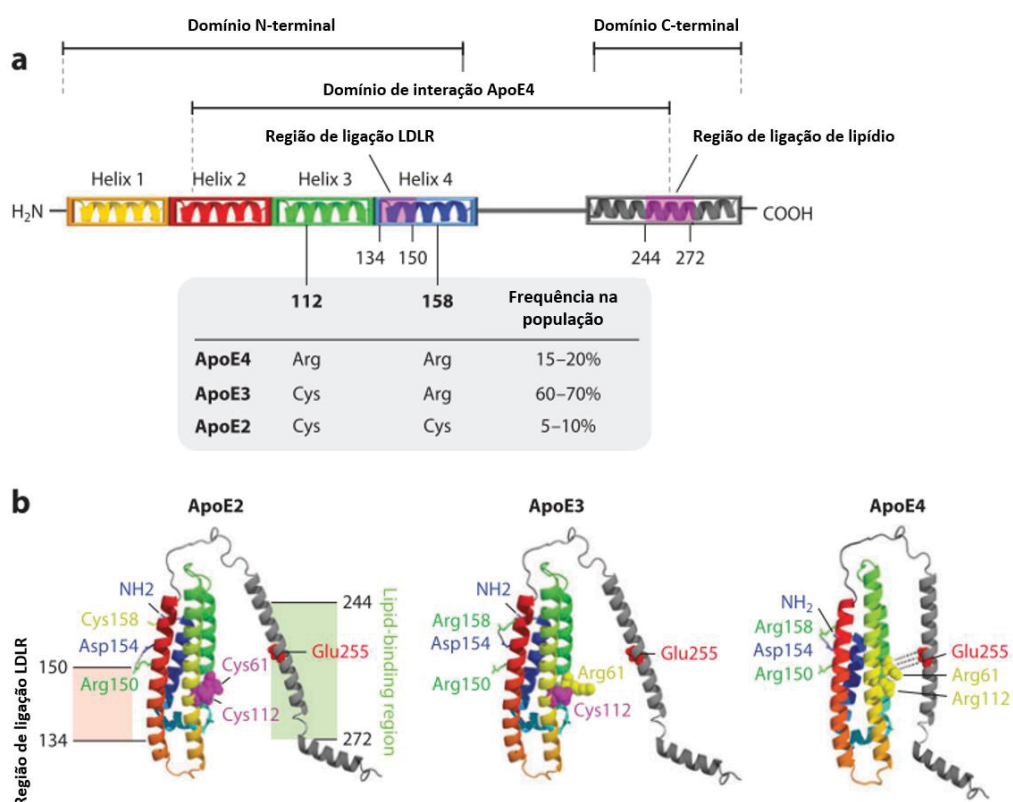
FIGURA 12 - ARQUITETURA GENÔMICA DA DOENÇA DE ALZHEIMER



LEGENDA: A figura representa loci genômicos associados com DA ou endofenótipos, tais como medições de proteína amiloide e / ou tau no líquido cefalorraquidiano, deposição de amiloide medida por tomografia de emissão de positron (PET) ou estudos post-mortem e metabolismo de glicose no cérebro conforme medido por fluorodeoxiglicose (FDG) -PET. Genes com evidência funcional suficiente para sugerir que eles são o gene causal em seus respectivos loci são anotados na figura. Os loci não marcados indicam que o gene causal na região ainda é desconhecido (NEUNER et al., 2020).

Dentre os genes associados com a DA de início tardio, o alelo *APOE*ε4* é o que leva a uma maior susceptibilidade, podendo aumentar em até 15 vezes a chance de desenvolvimento da doença em indivíduos homocigotos (SCHELLENBERG; MONTINE, 2012; LANE et al., 2018; YAMAZAKI et al., 2019). Curiosamente, o efeito do alelo *APOE*ε4* varia entre as populações, sugerindo que a interação desse com demais variantes gênicas interfira no risco a LOAD (NEUNER et al., 2020). O gene *APOE* codifica a apolipoproteína E que apresenta três isoformas: ApoE*ε2, ApoE*ε3 e ApoE*ε4. O alelo ApoE*ε2 apresenta frequência de 5 a 10% na população geral e 5% em indivíduos com DA, sendo considerado um alelo raro, mas protetivo à DA. O alelo ApoE*ε3 é considerado o mais comum, com frequência geral de 60 a 70% na população geral e 59% em indivíduos com DA. Já o alelo ApoE*ε4 está presente em cerca de 15 a 20% da população geral e 37% na população com DA (YU et al., 2014; KLOSKE; WILCOCK, 2020). A diferença nas isoformas são decorrentes de dois polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) (rs7412 e rs429358) que resultam em uma mutação de sentido trocado, alterando os aminoácidos (Cys/Arg) nas posições 112 e 158 (ApoE*ε2 - Cys112 / Cys158; ApoE*ε3 - Cys112 / Arg158; ApoE*ε4 - Arg112 e Arg158) (FIGURA 13) (YAMAZAKI et al., 2019). ApoE é o principal transportador de lipídios e colesterol no cérebro e atua reduzindo os níveis de colesterol, bem como promovendo a depuração de lipoproteínas. As diferenças estruturais nas isoformas ApoE afetam o modo como as lipoproteínas são depuradas. A exemplo disso, a ligação da isoforma ApoE*ε2 ao receptor de lipoproteínas de baixa densidade (LDLR) é 50 vezes mais fraca que a ligação nas demais isoformas (YAMAZAKI et al., 2019). Dessa maneira, ApoE*ε4 tem sido associada com a deposição de βA, formação de emaranhados neurofibrilares de proteína tau, neuroinflamação e muitas vias subsequentes (KLOSKE; WILCOCK, 2020).

FIGURA 13 - ISOFORMAS DA APOE, FREQUÊNCIA POPULACIONAL E ESTRUTURA DA MOLÉCULA



A – Representação linear da estrutura da Apolipoproteína E humana. **B** – Modelo em 3D das diferentes isoformas da ApoE. FONTE: Adaptado de YU et al., 2014.

Polimorfismos presentes próximos ao gene *BIN1* (*bridging integrator 1*) (rs6733839, rs744373) tem sido associado com LOAD em diversos estudos (HOLLINGWORTH; HAROLD; SIMS; et al., 2011; CROTTI et al., 2019; FRANZMEIER et al., 2019). Este gene está envolvido na endocitose, sustentando a integridade do citoesqueleto. Recentemente, observou-se o seu envolvimento na regulação do peptídeo tau, podendo estar relacionado na produção de emaranhados neurofibrilares intraneuronais (TAN, M.-S. et al., 2013; SARTORI et al., 2019; THOMAS et al., 2019; CROTTI et al., 2019; FRANZMEIER et al., 2019). Além disso, pode estar envolvido no tráfego endossomal intracelular, inflamação, homeostase do cálcio e apoptose (TAN, M.-S. et al., 2013).

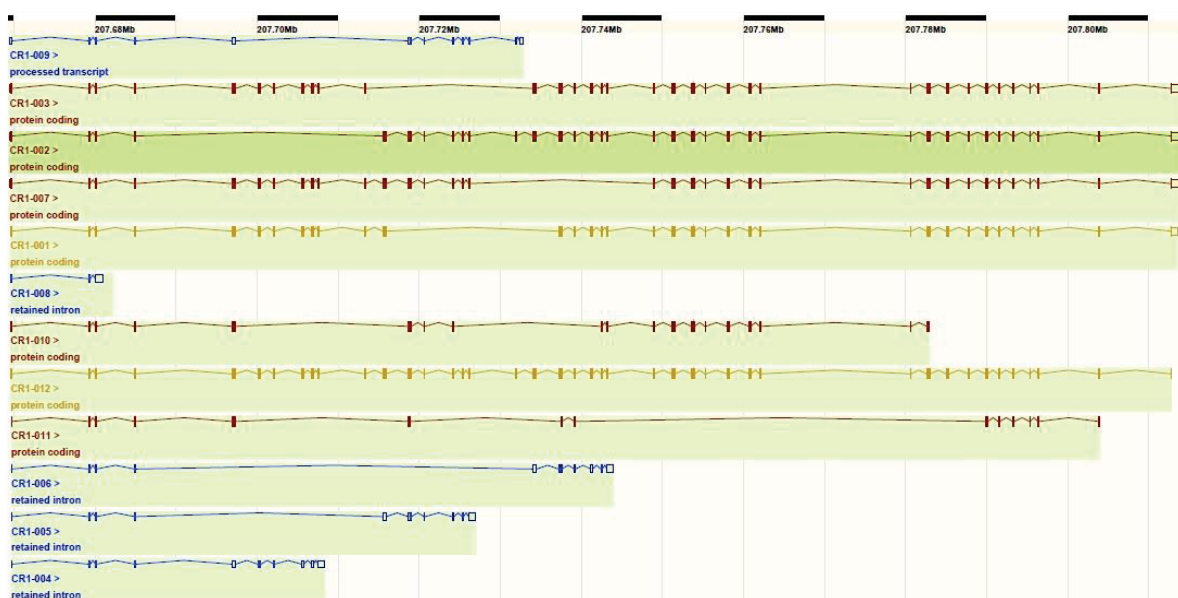
O rs10838725 presente no gene *CELF1* (*CUGBP Elav-like family member 1*) também tem sido associado a LOAD (LAMBERT et al., 2013; KARCH et al., 2016; MARIONI et al., 2018). CELF-1 é uma proteína de ligação a RNA relacionada à

regulação de diferentes eventos pós-transcricionais, processamento alternativo, tradução e estabilidade do mRNA (BEISANG et al., 2012; BATEMAN et al., 2017). Sua função na DA ainda não está elucidada, embora há indícios de que esse SNP não seja o causal.

2.1.5.1 Receptor 1 do complemento (CR1)

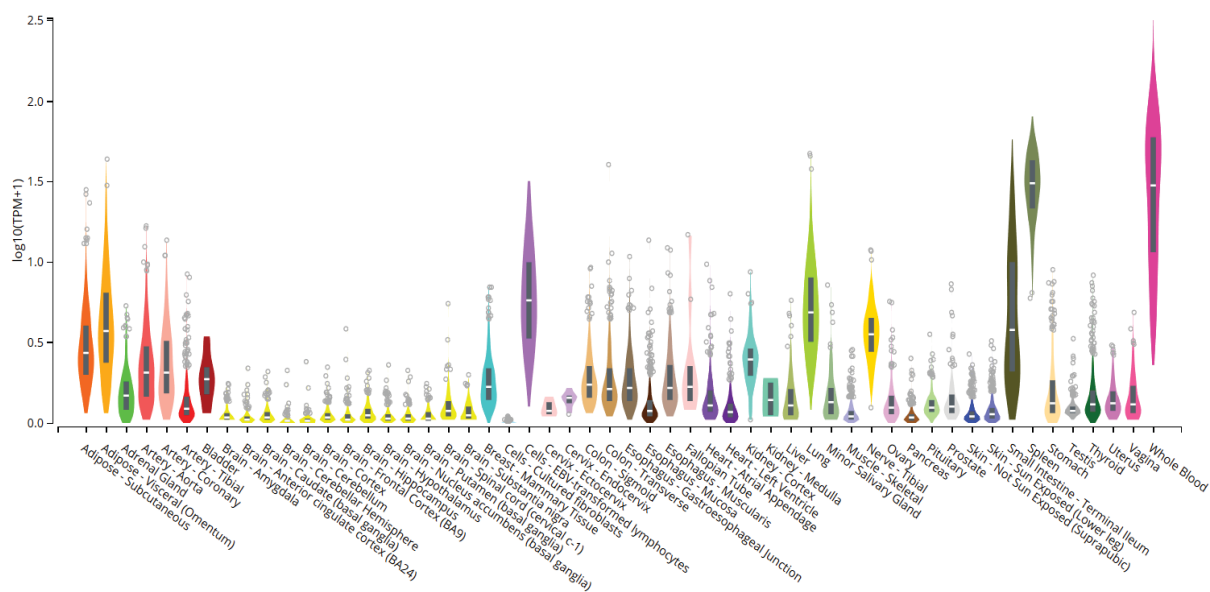
O gene *CR1* (OMIM: 120620) está localizado na banda 2, região 3, do braço longo do cromossomo 1 (1q32), juntamente com outros genes reguladores do sistema complemento (*receptor 2 do complemento - CR2*; *fator H - FH*) (REY-CAMPOS; RUBINSTEIN, 1988; LIU; NIU, 2009). É um gene que possui processamento alternativo, apresentando doze transcritos com variação no número de exons entre eles. Dos doze transcritos, sete apresentam potencial de codificação de proteína, um é apenas processado, e os demais apresentam retenção de introns (FIGURA 14) (Ensembl - Disponível em: <<https://cutt.ly/ffFLYaD>> Acesso em: 17/09/2020). O gene é expresso em todos os tecidos, com uma alta taxa de expressão no sangue total e no baço (FIGURA 15) (GTEx - Disponível em: <<https://cutt.ly/EfFZbh3>> Acesso em: 17/09/2020).

FIGURA 14 - TRANSCRITOS DO *CR1*



Os blocos preenchidos representam os exons, os blocos não preenchidos representam regiões não traduzidas, as linhas entre os blocos representam os introns. Os transcritos em vermelho e laranja são codificadores de proteínas; os transcritos em laranja foram analisados pelos navegadores genômicos Ensembl e Havana; e os transcritos em azul são transcritos processados. A flecha indica o sentido da transcrição. FONTE: Ensembl - Disponível em: <<https://cutt.ly/ffFLYaD>> Acesso em: 17/09/2020.

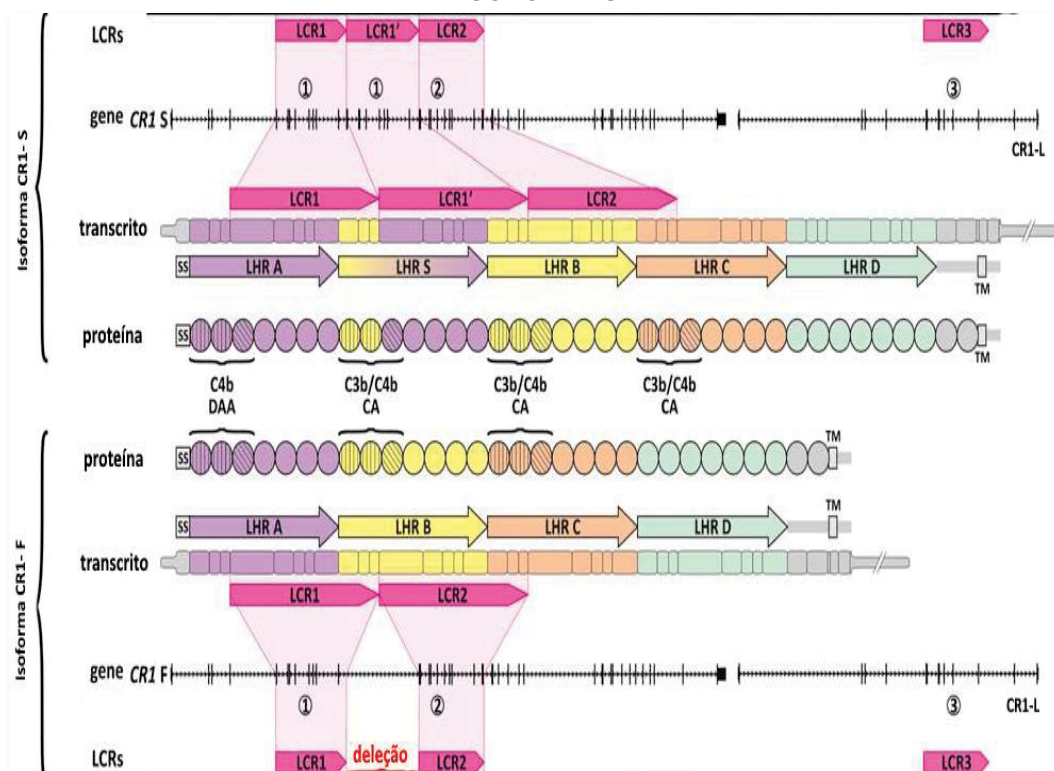
FIGURA 15 - EXPRESSÃO DE CR1 EM DIFERENTES TECIDOS



FONTE: GTEX - Disponível em: <<https://cutt.ly/EfZbh3>> Acesso em: 17/09/2020.

A molécula de CR1 pode apresentar até quatro isoformas, decorrentes de inserções e deleções, e SNPs que levam a alteração na densidade e tamanho da molécula (KRYCH-GOLDBERG; ATKINSON, 2001; LIU; NIU, 2009). Isso é possível, pois o gene apresenta sequências repetitivas com baixo número de cópias, nomeadas LCR (*Low Copy Repeat*). As LCRs 1 e 2 encontram-se em região codificante, podendo apresentar uma cópia extra derivada de LCR1 através de uma recombinação não-homóloga (LCR1'). Quando presente, LCR1' codifica um sítio extra de ligação para C3b/C4b (WONG et al., 1986; BROUWERS et al., 2012). A LCR3 está presente no *CR1-L* (gene *CR1-like*) próximo ao CR1 (FIGURA 16) (BROUWERS et al., 2012). Dessa maneira, CR1 pode ser encontrado nas isoformas: CR1*A (CR1*F ou CR1*1) com 220 kDa e mais frequente nas populações (87% - europeus, 82% - afro-americanos, 89% - mexicanos e 91,6% - asiáticos); CR1*B (CR1*S ou CR1*2) com 250 kDa e um sítio adicional para ligação ao C3b/C4b (8,4% - indianos e asiáticos, 11% nas demais populações investigadas); CR1*C (CR1*F' ou CR1*3) de 190 kDa e CR1*D (CR1*4) de 280 kDa (ambas isoformas com frequência de menos de 5% nas populações investigadas) (DYKMAN et al., 1983, 1984; BIRMINGHAM; HEBERT, 2001; MOULDS et al., 2001; BROUWERS et al., 2012).

FIGURA 16 - ARQUITETURA GENÔMICA DO LOCUS DE *CR1* EM RELAÇÃO ÀS PRINCIPAIS ISOFORMAS.



Os segmentos genômicos estão representados acima e abaixo, codificando as duas principais isoformas alélicas de *CR1*: *CR1-S* (*CR1*B*) e *CR1-F* (*CR1*A*). As barras verticais correspondem a exons. As repetições de baixo número de cópias (LCR) são representados pelas flechas horizontais na cor pink, indicando sua localização e orientação da transcrição, sendo que *CR1-F* apresenta deleção do LCR1'. No transcrito maduro, cada bloco representa um exon, cuja cor corresponde a diferentes domínios da proteína. Blocos largos representam sequências codificantes, e blocos estreitos, sequências não traduzidas (UTRs). Setas correspondem a longos domínios de repetição homóloga- LHR (*Long Homologous Repeat*). SS: peptídeo sinal. TM: região transmembrana. Na proteína, círculos representam domínios funcionais de *CR1*, chamados SCR ou repetição consenso curta (*Short Consensus Repeat*). As primeiros três SCR em LHR A, S, B e C são necessárias para a ligação ao C3b/C4b, inibindo a formação do MAC (decaimento da atividade ou atividade co-fatora na clivagem de C3b e C4b). FONTE: Adaptado de BROUWERS et al., 2012.

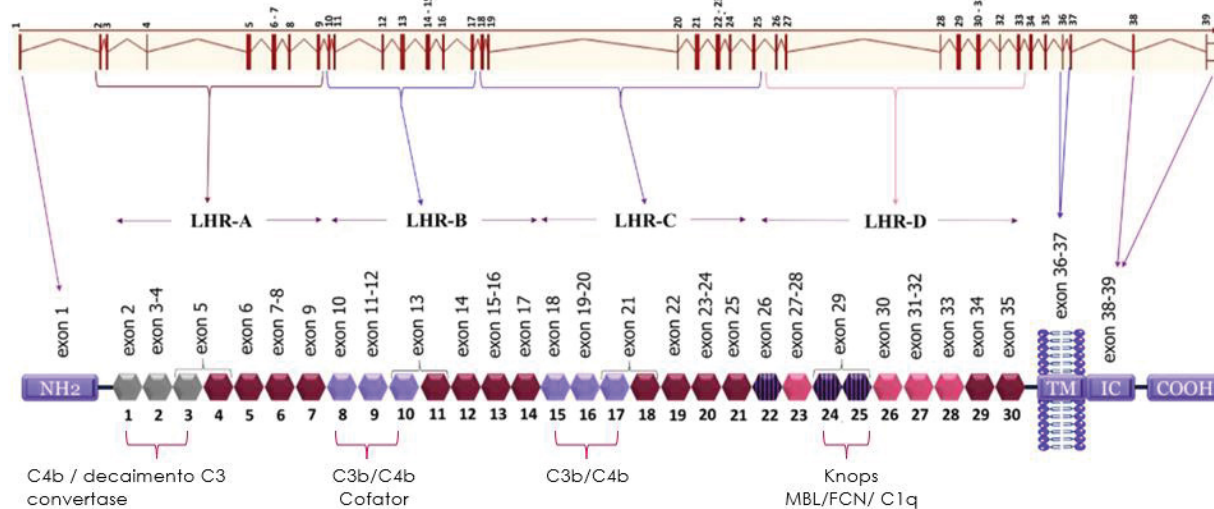
Além disso, *CR1* apresenta diversos SNPs espalhados ao longo do gene em regiões regulatórias e codificadoras, sendo que algumas dessas variantes pertencem ao grupo sanguíneo Knops (MOULDS et al., 2010; VELDHUISEN et al., 2011). Tais polimorfismos apresentam uma alta discrepância em suas frequências alélicas entre as populações de origem africana e europeia (LIU; NIU, 2009; MOULDS et al., 2010).

CR1 também apresenta polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP -Restriction Fragment Length Polymorphism), obtido com a enzima Hind III, que corresponde ao SNP rs11118133 no intron 27 (*g.207589899A>T* ou *g.207589899A>C*). Tal polimorfismo pode resultar em um fragmento de 7,4 Kb (alelo

H) ou em 6,9 Kb (alelo L). Existe uma correlação entre os alelos e o número de moléculas CR1 expressas na superfície de membrana de eritrócitos (E-CR1), onde homocigotos para o alelo L apresentam baixa expressão, homocigotos para o alelo H possuem alta expressão, e heterocigotos (H/L) apresentam expressão intermediária (KRYCH-GOLDBERG; ATKINSON, 2001).

A molécula de CR1 é uma glicoproteína multimodular polimórfica transmembrana de cadeia única, constituída em sua porção extracelular por 30 domínios SCR (também conhecidos como CCP ou domínios sushi), seguidos por um curto domínio transmembrana e intracitoplasmático (FURTADO et al., 2008; LIU; NIU, 2009; JACQUET et al., 2013). Os 30 domínios SCR são dispostos em grupos de sete, formando quatro longas repetições homólogas (LHR-A, LHR-B, LHR-C e LHR-D), sendo que os dois últimos SCR constituem os domínios terminais (LIU; NIU, 2009). A composição dos SCRs em sítios funcionais está descrita na FIGURA 17.

FIGURA 17 – ESTRUTURA GÊNICA E MOLECULAR DO CR1



Cada bloco em forma de hexágono representa um SCR (repetição de consenso curta, 1 a 30), codificados pelos exons 2-35, mostrados logo acima. Os outros exons codificam: a região aminoterminal (NH₂, exon 1), domínio transmembranar (TM, exons 36-37) e o domínio carboxi-terminal intracitoplasmático (IC COOH, exons 38-39), que são todos mostrados em azul. Existem três locais de ligação para as opsoninas C4b (SCR 1-3, 8-10 e 15-1, na cor cinza e lilás), dos quais dois também são locais de ligação C3b (SCR 8-10 e 15-17, ambos na cor lilás). Os SCRs 22-28 ligam C1q, MBL e ficolinas. Os SCRs 22, 24 e 25 (blocos tracejados em azul) carregam antígenos de grupo sanguíneo Knops. As quatro repetições homólogas longas (LHR) desta proteína são representadas: 1-7, 8-14, 15-21, 22-28. Os locais funcionais de 8-10 e 15-17 são quase idênticos. TM - domínio transmembranar; IC - domínio intracitoplasmático. FONTE: Adaptado de KRETZSCHMAR et al., 2018.

A função do CR1 varia de acordo com o tipo celular onde é expresso, sendo encontrado na membrana de células como eritrócitos, neutrófilos, granulócitos, eosinófilos, monócitos, macrófagos, linfócitos B, uma subpopulação de células T CD4+, células dendríticas foliculares, células de Langerhans na pele, podócitos glomerulares, micróglia e neurônios sendo solúvel no plasma, urina e líquido cefalorraquidiano (LIU; NIU, 2009; DABORG et al., 2012; HAZRATI et al., 2012). O CR1 é um regulador negativo do sistema complemento, e realiza o sequestro de C3b e C4b, levando a desestabilização e degradação de C3 e C5 convertases (FURTADO et al., 2008; KHERA; DAS, 2009), podendo também atuar como cofator para inativação de C3b e C4b, regulando a via alternativa do complemento (LIU; NIU, 2009). Além disso, CR1 pode otimizar o processo de fagocitose e remoção de complexos imunes opsonizados com fragmentos do complemento (C3b, C4b e MBL) ou imunoglobulinas (SENGELØV et al., 1994; GHIRAN et al., 2000; BOACKLE, 2003; FURTADO et al., 2008; KHERA; DAS, 2009; LIU; NIU, 2009). Ademais, CR1 regula a proliferação de linfócitos B, prevenindo o reconhecimento inadequado de autoantígenos por estes linfócitos (KHERA; DAS, 2009; TÖRÖK et al., 2015). Em sua forma solúvel (sCR1) desempenha uma potente inibição do sistema complemento no local (KHERA; DAS, 2009).

O CR1 foi associado com DA pela primeira vez em um estudo GWAS realizado em 2009, onde observaram uma maior susceptibilidade para portadores do alelo *rs6656401*A*, levantando a hipótese de que possivelmente CR1 estivesse envolvido na limpeza de placas β A (LAMBERT et al., 2009). Dessa maneira, acreditava-se que as isoformas maiores poderiam conferir uma proteção a DA, visto que teriam um sítio de ligação a C3b/C4b, tornando o processo de limpeza mais eficiente. Porém, isso não foi observado por Brouwers e colaboradores (2012), que encontraram a isoforma CR1*B associada a susceptibilidade a DA. No mesmo ano, Hazrati e colaboradores (2012) observaram que as isoformas CR1*A e CR1*B são expressas de maneira diferencial no cérebro, sendo que a isoforma CR1*B se apresentava em forma vesicular e em menor quantidade na membrana celular, já CR1*A era filiforme. Além disso, Mahmoudi e colaboradores (2015), conseguiram estabelecer a relação genótipo / isoforma, onde indivíduos *rs6656401*A/A* apresentavam apenas CR1*B sendo expresso, além de proporem o papel de alelo silencioso para CR1*B, visto que aparentemente a molécula não desempenhava sua

função. Também foi observado o nível de sCR1 aumentado em soro de pacientes de DA (MAHMOUDI et al., 2018).

Grande parte dos estudos que observaram associações de *CR1* com DA foram realizados com populações europeias e asiáticas (LAMBERT et al., 2009; BROUWERS et al., 2012; JIN et al., 2012; MAHMOUDI et al., 2015, 2018), sendo que estudos com populações latino-americanas não validaram as associações relatadas (SANTOS-REBOUÇAS et al., 2017; MORENO et al., 2017; SANTOS, DOS et al., 2017).

2.1.5.2 Loci de associação a fenótipos de expressão quantitativa (QTLs)

Os eQTLs correspondem a regiões genômicas que carregam uma ou mais variantes na sequência de DNA que influenciam o nível de expressão de um determinado gene em diferentes tecidos (ALBERT; KRUGLYAK, 2015). Já os sQTLs são variantes que influenciam no processamento alternativo de genes, favorecendo o aumento de determinado transcrito (BOOPATHI, 2020). Podem ser classificados de acordo com sua localização (local ou distância do(s) gene(s) sobre o(s) qual(is) tem que influência), assim como de acordo com o mecanismo utilizado para alterar a expressão (*cis* ou *trans*) (ROCKMAN; KRUGLYAK, 2006; ALBERT; KRUGLYAK, 2015).

Grande parte das associações observadas em GWAS são encontradas em regiões não codificantes e que muitas vezes não estão em desequilíbrio de ligação com variantes causais (ALBERT; KRUGLYAK, 2015; HU et al., 2019). Dessa forma, a análise de eQTLs provou ser um método robusto para descrever como a variação nos fenótipos pode ser atribuída a um determinado genótipo (BATTLE; MONTGOMERY, 2014; BOOPATHI, 2020). Sendo assim, muitas variantes associadas em GWAS de DA que ainda não possuem uma explicação causal, tem sido reavaliadas através de análises de eQTLs, a fim de buscar possíveis alterações da expressão de genes relacionados com a fisiopatologia da doença, possibilitando a explicação das associações encontradas (HU et al., 2019).

2.1.5.3 RNAs não codificantes (ncRNAs)

A interferência por RNAs não codificadores é um dos mecanismos epigenéticos que vem ganhando cada vez mais destaque na regulação da expressão gênica e associação com doenças (CIPOLLA et al., 2018; WU; KUO, 2020). Os ncRNAs são transcritos do DNA, mas que não codificam proteínas. Ao invés disso, podem participar de inúmeros processos regulatórios e funcionais, podendo interagir com o DNA, outros RNAs e proteínas (TOLLEFSBOL, 2011). Dentre os ncRNAs que podem atuar na regulação epigenética destacam-se os micro-RNAs (miRNAs), e longos RNAs não codificantes (lncRNAs).

Os miRNAs são moléculas de até 23 nucleotídeos que podem se ligar a regiões 3'UTR, sequência codificadora ou 5'UTR de mRNAs alvos, levando a inibição da tradução ou a degradação do mRNA (TOLLEFSBOL, 2011; ALMEIDA et al., 2011). Um único miRNA pode regular negativamente a expressão de centenas de genes alvos, podendo também estar envolvidos em mecanismos intrincados que envolvem feedback, auto-regulação e, em alguns casos, metilação (TOLLEFSBOL, 2011). Diversos miRNAs já foram descritos como associados a DA, regulando genes chaves na doença como por exemplo, os que codificam a proteína precursora amiloide (APP) e o precursor 1 de beta secretase (BACE1) (TAN, L. et al., 2013).

lncRNAs são transcritos maiores que 200 nucleotídeos, pouco conservados entre as espécies, que apresentam geralmente expressão tecido-específica e podem realizar a regulação da expressão gênica na transcrição, pós-transcrição, tradução e pós-tradução (RINN; CHANG, 2012; HEZRONI et al., 2015). Os lncRNAs apresentam diversos padrões e funções moleculares distintas, o que dificulta sua classificação e caracterização. Para a sua classificação, é considerado a localização cromossômica desses lncRNAs em relação aos genes codificadores próximos, podendo ser: intergênicos (lincRNAs), senso (intrônicos e de sobreposição), antisenso (intrônicos ou transcritos antisenso naturais) e bidirecionais (DERRIEN et al., 2012). Também podem ser classificados quanto sua localização celular (citoplasma, núcleo ou ambos), e aonde irão atuar, podendo ser *cis* (regulando genes ou alterando o estado da cromatina em regiões próximas) ou *trans* (em genes distantes) (KOPP; MENDELL, 2018).

Os lncRNAs podem desempenhar diferentes funções, que foram organizadas em quatro arquétipos por Wang e colaboradores (2011): Sinal – o lncRNA

desempenha o papel de molécula sinalizadora, levando a ativação ou silenciamento gênico; Isca – o lncRNA compete com outros RNAs e proteínas por sítios de ligação, funcionando como um regulador negativo; Guia – o lncRNA se liga a proteínas a fim de formar complexos e o guia até o sítio alvo; Andaime – lncRNA se liga a diversas proteínas facilitando a interação das mesmas. É importante ressaltar que um lncRNA pode pertencer a mais de um arquétipo.

Recentemente lncRNAs tem sido associados com a DA, embora grande parte desses ainda não estejam bem caracterizados e seu papel ainda não seja bem definido (HAN et al., 2019; WANG et al., 2020).

2.2 DOENÇA DE PARKINSON (DP)

2.2.1 A doença e seus aspectos clínicos

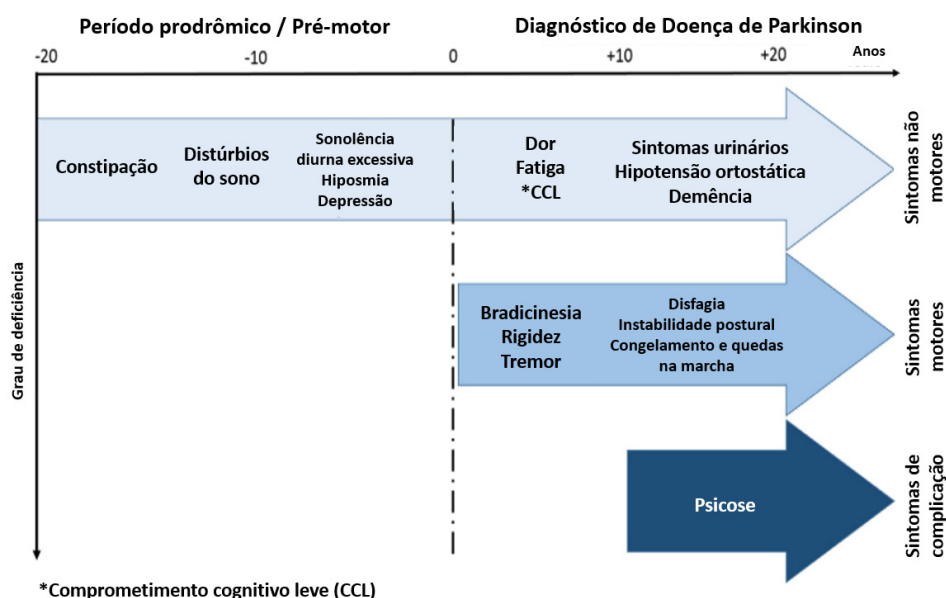
A doença de Parkinson (DP) (OMIM#168600) é a segunda doença neurodegenerativa crônica mais comum, afetando aproximadamente 2% da população acima dos 65 anos (MIGLIORE; COPPEDÈ, 2009; DRAOUI et al., 2020). Embora tenha sido descrita por James Parkinson em 1817, a doença já era conhecida na Índia antiga sob o nome de "Kampavata" (KEMPSTER et al., 2007; OVALLATH; DEEPA, 2013).

A DP encontra-se dentro de um grupo heterogêneo de doenças de amplo espectro conhecido como parkinsonismo, que apresentam em comum sintomas característicos do Parkinson, porém em combinações variáveis, podendo ser ocasionadas por outras doenças ou fatores externos, como por exemplo o uso de fármacos (FONTES, 2011; HAYES, 2019).

Os sintomas da DP podem ser caracterizados como não motores e motores. Os sintomas não motores antecedem os primeiros sintomas motores, ocorrendo anos antes do diagnóstico da DP, sendo considerados bons marcadores para um diagnóstico precoce. Dentre esses sintomas, destacam-se os distúrbios do sono, disfunções no olfato, constipação, ansiedade, depressão, déficits cognitivos e demência (AURICH et al., 2017; KORCZYN et al., 2017; TARGA et al., 2018; FAGOTTI et al., 2019; HAYES, 2019). A manifestação dos primeiros sintomas motores ocorre quando já houve a perda de cerca de 70% dos neurônios dopaminérgicos, correspondendo ao período em que normalmente é feito o primeiro diagnóstico (CORTI et al., 2011). Dentre os sintomas motores clássicos estão o tremor em repouso, dificuldade para iniciar os movimentos (acinesia), tornando-os lentos e incompletos (bradicinesia) e com amplitude reduzida (hipocinesia), além de apresentarem rigidez muscular e instabilidade postural, resultando na marcha parkinsoniana característica (FONTES, 2011; KALIA; LANG, 2015). Adicionalmente, outros sintomas secundários podem ocorrer com a progressão da doença: distúrbios da fala, secura na boca, dificuldade de deglutição, perda de expressão facial, problemas dermatológicos, dores, fadiga, tontura, confusão, demência e problemas urinários (FONTES, 2011) (FIGURA 18). É importante ressaltar que a sintomatologia da DP se desenvolve e progride de maneira diferente entre os indivíduos, podendo

ser mais rápida para alguns pacientes e podendo se estender por 20 anos ou mais (FONTES, 2011; KALIA; LANG, 2015).

FIGURA 18 - SINTOMAS DA DP AO LONGO DO TEMPO.



FONTE: Adaptado de DRAOUI et al., 2020.

Embora a etiologia dessa patologia ainda não esteja completamente elucidada, vários fatores ambientais, genéticos⁷ e do metabolismo celular⁸ têm sido associados com o aumento de risco para o desenvolvimento da doença. A exposição a pesticidas (rotenona e MPTP) e herbicidas (Paraquat) já foi associada a DP, sendo essas toxinas utilizadas para indução ao Parkinson em modelos animais da doença (ELBAZ et al., 2016; DRAOUI et al., 2020). Além disso, o hábito tabagista e consumo de cafeína foram associados como fatores protetivos a doença (HERNÁN et al., 2002; ELBAZ et al., 2016).

2.2.2 Epidemiologia

A DP é a segunda doença neurodegenerativa crônica mais comum na população idosa. Tem apresentado um crescimento rápido em termos de prevalência,

⁷ Os fatores genéticos envolvidos na DP serão comentados no item 2.2.5 dessa tese.

⁸ Os fatores do metabolismo celular associados com a DP serão comentados no item 2.2.3 dessa tese.

incapacidade e morte, podendo ter o dobro do número de pacientes de 2005 até 2030 (DORSEY et al., 2007; ZESIEWICZ, 2019; SIMON et al., 2020; DRAOUI et al., 2020).

Em países industrializados, possui a prevalência estimada em até 0,3% de toda a população, ocorrendo em cerca de 1% em pessoas acima de 60 anos e 3% acima de 80 anos (LAU, DE; BRETELER, 2006; DEXTER; JENNER, 2013). Apresenta uma taxa de incidência de 8 a 18 pessoas /100.000 pessoas / ano (DRAOUI et al., 2020). Dentre o total de casos, apenas 10% ocorrem entre 20 e 50 anos, caracterizando a doença em seu espectro familiar (LAU, DE; BRETELER, 2006; DEXTER; JENNER, 2013; DRAOUI et al., 2020). A duração média da doença é de 15 anos, desde o diagnóstico à morte (DRAOUI et al., 2020).

Em grande parte dos estudos, há relatos que a DP é mais prevalente em homens do que em mulheres, com proporções entre 2:1, o que poderia ter relação com o papel neuroprotetor do estrogênio em mulheres, embora ainda seja necessários mais estudos para confirmação (DEXTER; JENNER, 2013; DRAOUI et al., 2020).

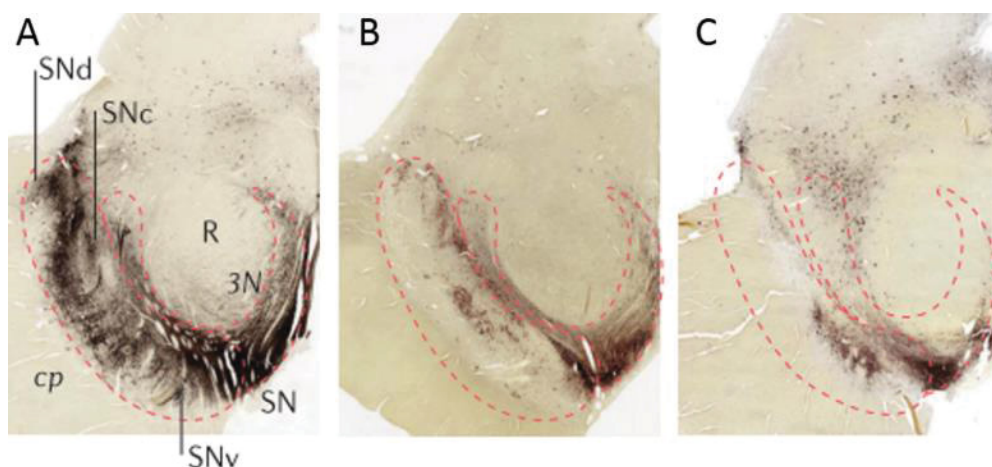
Alguns autores reportam que pode ocorrer uma variação na prevalência da doença entre as etnias, porém os resultados ainda são conflitantes (LAU, DE; BRETELER, 2006; BAILEY et al., 2020). Recentemente, Bem-Joseph e colaboradores (2020), realizaram uma revisão de literatura com diversos estudos publicados em diferentes etnias e a DP, concluindo que diferenças genéticas e geográficas provavelmente interfiram nas manifestações clínicas, epidemiológicas e na mortalidade, porém a natureza dessas diferenças ainda não está elucidada. Aparentemente, pacientes afrodescendentes e hispânicos apresentam risco aumentado ao comprometimento cognitivo, mas são necessários mais estudos para corroborar essa informação.

2.2.3 Fisiopatologia

São considerados como biomarcadores da DP, a perda de neurônios dopaminérgicos na substância *nigra pars compacta* (SNpc) e a presença de Corpos de Lewy (LOTHARIUS; BRUNDIN, 2002; DEXTER; JENNER, 2013). A perda progressiva dos neurônios dopaminérgicos na SNpc é evidenciada anatomicamente pela despigmentação da porção ventrolateral dessa estrutura (DEXTER; JENNER, 2013; DRAOUI et al., 2020) (FIGURA 19). Isso resulta em uma redução do neurotransmissor dopamina no estriado (constituído pelo núcleo caudado e putâmen),

provocando a diminuição de atividade na via direta do circuito dos núcleos da base (mediada por receptores D1) e aumento na via indireta (receptores D2), resultando em distúrbios dos movimentos corporais voluntários (DRAOUI et al., 2020). Supõe-se que a fisiopatologia inicia no núcleo dorsal do nervo vago e na região reticular da medula, avançando para a zona frontal, SNpc, mesocortex e neocortex (FONTES, 2011). Além do déficit de neurônios dopaminérgicos, há relatos de disfunção nas vias colinérgica, serotoninérgica, glutamatérgica e noradrenérgica. Por alguns, estas alterações são consideradas como alterações secundárias, devido a um sistema de compensação à desregulação na via dopaminérgica, ou devido ao processo degenerativo da DP (CHARVIN et al., 2018).

FIGURA 19 - EVOLUÇÃO DA DESPIGMENTAÇÃO DA SUBSTÂNCIA *NIGRA* EM CORTES TRANSVERSAIS DO MESENCÉFALO.



As lâminas estão classificadas de acordo com os estágios propostos por Braak. A: estágio I-II, B: estágio III-IV, C: estágio V-VI. R: núcleo vermelho. SNd: camada dorsal do SNC. SNv: camada ventral do SNC. 3N: nervo III. Cp: pedúnculo cerebral. FONTE: DRAOUI et al., 2020.

Devido a presença dos corpos de Lewy, a DP pode ser classificada como uma sinucleinopatia. Os corpos de Lewy são constituídos de inclusões intracitoplasmáticas insolúveis, cuja composição principal inclui agregados proteicos de α -sinucleína (LOTHARIUS; BRUNDIN, 2002; KAPEZINSKI et al., 2011; TREDICI, DEL; BRAAK, 2012). A α -sinucleína é uma proteína de 140 aminoácidos, que se encontra abundante no citoplasma dos neurônios e que possivelmente atua estabilizando as vesículas sinápticas dopaminérgicas. Essa proteína apresenta um sistema de degradação lenta, o que favorece a formação de agregados (SEN; WEST, 2009). Embora sejam considerados biomarcadores na DP, o seu papel na patogênese da doença

permanece pouco conhecido, não sendo exclusivos dessa doença (TREDICI, DEL; BRAAK, 2012).

Até o momento, não é completamente elucidado e determinado quais são os mecanismos moleculares que levam ao processo de neurodegeneração seletiva observado na fisiopatologia da DP, porém existem alguns mecanismos candidatos que são alvos de diversos estudos, representados brevemente na TABELA 1.

TABELA 1 - POSSÍVEIS MECANISMOS ENVOLVIDOS DA FISIOPATOLOGIA DA DP

Mecanismo	Possível envolvimento	Referências
Agregação de α -sinucleína	α -sinucleína pode exibir propriedades neurotóxicas em um processo patogênico, tornando-se agregados insolúveis e levando a morte celular	(LASHUEL et al., 2013; GHIGLIERI et al., 2018)
Transmissão de α -sinucleína célula a célula semelhante a prion	Algumas linhas defendem que a α -sinucleína pode se comportar como príons, sendo liberada no espaço extracelular e internalizada por neurônios vizinhos, dessa maneira disseminando os agregados pelo cérebro	(BRUNDIN et al., 2010; ANGOT et al., 2010; STEINER et al., 2018)
Disfunção mitocondrial e estresse oxidativo	Disfunção do complexo I da cadeia respiratória (em parte devido ao acúmulo I de α -sinucleína), resultando em uma alteração no potencial de membrana, comprometimento do controle de qualidade mitocondrial, interrupção da homeostase do cálcio e liberação aumentada de citocromo c. Aparentemente, os neurônios dopaminérgicos da SNpc são particularmente vulneráveis ao estresse oxidativo	(BOSE; BEAL, 2016; PARK et al., 2018)
Estresse grave do retículo endoplasmático	Resultante do acúmulo de proteínas mal dobradas ou não dobradas, contribuindo para a morte neuronal	(REMONDELLI; RENNA, 2017)
Comprometimento da autofagia	Pode aumentar a liberação e transferência de α -sinucleína de célula para célula e levar ao acúmulo de mitocôndrias disfuncionais	(MINAKAKI et al., 2018)
Disfunção no transporte axonal	Pode ocorrer devido à deficiência de energia (disfunção mitocondrial) e / ou a presença de agregados de α -sinucleína, tornando-se obstáculos ao transporte axonal de rotina	(MORFINI et al., 2009)
Sincronização neural anormal nos gânglios da base e alterações sinápticas	Alterações em circuitos cerebelares e nas interações entre o cerebelo e os gânglios da base também são considerados importantes na fisiopatologia da PD. A fisiopatologia do circuito motor resulta da perda de dopamina, mas também de distúrbios em outros neurotransmissores, como colinérgicos e glutamatérgicos	(BURRE, 2015; CALIGIORE et al., 2016)

Neuroinflamação	Astrogliose e microgliose intensas podem estar associadas à plasticidade corticostriatal anormal. Embora talvez não seja o gatilho inicial, a neuroinflamação é suspeita de ser um contribuidor essencial para patogênese da DP	(KAUR et al., 2017)
-----------------	---	---------------------

FONTE: Adaptado de CHARVIN et al., 2018.

2.2.4 Diagnóstico e tratamento

O diagnóstico da DP considera a história clínica e familiar do paciente, sua idade atual e o início dos sintomas, somados aos resultados de exames clínicos para verificação dos sintomas característicos da doença. De maneira geral, o diagnóstico torna-se complexo, devido a existência de inúmeras patologias que apresentam características e sintomatologias semelhantes a DP, ou ao uso de fármacos específicos, que podem originar sintomas semelhantes ao parkinsonismo, sendo estes, utilizados como critérios de exclusão no diagnóstico (BARBOSA; SALLEM, 2005; FONTES, 2011). Como ferramentas de auxílio para a exclusão de demais patologias, podem ser utilizadas a tomografia computadorizada (TC) e a ressonância magnética (RM), dentre outros exames laboratoriais (FONTES, 2011).

São considerados critérios importantes no diagnóstico clínico da DP: a presença do típico tremor de repouso de início unilateral e uma resposta positiva ao uso de levodopa (KALIA; LANG, 2015; HOMAYOUN, 2018). Além disso, como padrão ouro no diagnóstico é feita uma avaliação neuropatológica, observando se há perda neuronal moderada a grave na SNpc, com a presença de corpos de Lewy nos neurônios dopaminérgicos sobreviventes (DEXTER; JENNER, 2013; KALIA; LANG, 2015). Nesse sentido, pode ser utilizada a escala de Braak, que classifica em seis estágios a progressão temporal e espacial dos Corpos de Lewy dentro da DP (BRAAK et al., 2003; KALIA; LANG, 2015).

Como o diagnóstico de maneira geral ocorre a partir dos primeiros sintomas motores, caracterizando um estágio em que já há perda de massa encefálica, a busca por sintomas não-motores associados e outros biomarcadores para diagnósticos menos invasivos e precoce é de extrema importância. Infelizmente, a DP é progressiva e irreversível, e dessa forma, todos os tratamentos disponíveis até então, são paliativos, visando o controle dos sintomas, que podem se estender por muitos anos.

De maneira geral, a estratégia inicial de tratamento é a reposição de dopamina, a fim de ativar os neurônios dopaminérgicos remanescentes na substância negra, embora isso não evite o avanço da neurodegeneração (ZINGER et al., 2011). Dentre as drogas utilizadas para essa reposição, a levodopa (L-3,4 dihidroxifenilalanina - L-DOPA), precursora da dopamina, é considerada padrão ouro, que pode ser administrada em conjunto com a carbidopa, a fim de aumentar a viabilidade da levodopa no SNC e reduzir efeitos colaterais, como náuseas. Porém, a longo prazo, o efeito da droga passa a não ser tão efetivo, resultando em diversos efeitos colaterais, sendo necessário uma reavaliação do tratamento (BASTIDE et al., 2015; HAYES, 2019).

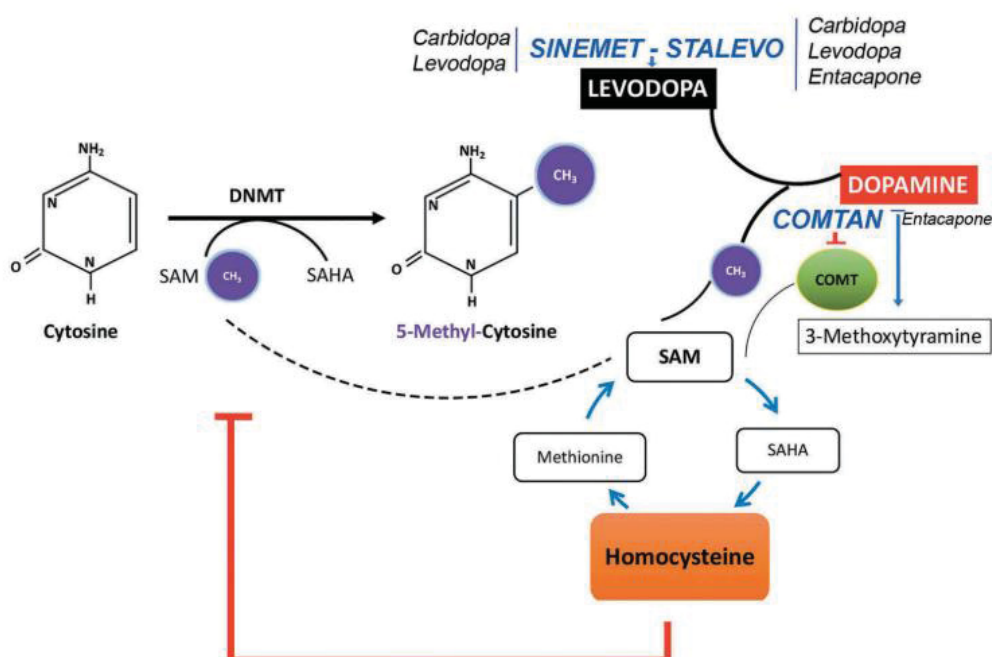
Alguns autores mostram que o uso de L-DOPA a longo prazo pode resultar em discinesia (alteração dos movimentos), entre outras diversas complicações, tais como distúrbios neurocomportamentais, sintomas autonômicos (náusea, hipotensão ortostática), sonolência diurna e complicações psiquiátricas (alucinações e delírios), embora alguns desses sintomas possam estar relacionados com a progressão da doença, e sua relação com a L-DOPA precise ser corroborada por mais estudos (BASTIDE et al., 2015). Também há relatos de que a L-DOPA desregule algumas vias do metabolismo, como por exemplo, a via do triptofano, alterando as proporções entre 3-hidroxiquinurenina e ácido quinurênico, colaborando para o quadro de discinesia (HAVELUND et al., 2017).

Estudos realizados com pacientes que utilizam a L-DOPA, já demonstraram que níveis séricos de vitamina B12 são mais baixos em pacientes. Quando a doença é acompanhada de quadro demencial, estes também apresentam redução sérica nos níveis de folato (CERAVOLO et al., 2013; FERREIRA, 2013). O destino metabólico da levodopa plasmática é a formação da 3-O-metildopa (3-OMD) através de sua metilação catalisada pela catecol-O-metiltransferase (COMT), a qual utiliza de grupos metil doados pela s-adenosilmetionina (SAM). Dessa forma, a metabolização da levodopa interfere diretamente no ciclo do um carbono⁹, levando a um aumento nos níveis de homocisteína plasmática, que em quantidade exacerbada pode resultar em diversas manifestações clínicas no SNC e inclusive, acelerar a morte dos neurônios dopaminérgicos (FIGURA 20) (KRUMAN et al., 2000; DUAN et al., 2002; FERREIRA,

⁹ O ciclo do um carbono será abordado em detalhes no item 2.2.6.1.1 dessa tese

2013). Além disso, o ciclo de um carbono está intimamente relacionado com o mecanismo de regulação da expressão gênica, e uma interferência nesse processo pode resultar em uma desregulação nos padrões de metilação de genes, levando a um processo patológico (MARTIGNONI et al., 2007; HENDERSON-SMITH et al., 2019). Dessa maneira, alguns estudos sugerem uma suplementação com vitamina B12 e ácido fólico para pacientes de DP, principalmente os que realizam o tratamento com a L-DOPA (QURESHI et al., 2008; FERREIRA, 2013).

FIGURA 20 - ALTERAÇÕES NO CICLO DO UM CARBONO DECORRENTE DO CATABOLISMO DE LEVODOPA



A conversão de levodopa em dopamina requer a quebra de S-adenosil metionina como doador de grupo metil. Esta é a mesma fonte de grupos metil usados por DNA metiltransferases (DNMTs) para metilar as citosinas presentes no DNA. Além disso, a homocisteína produzida pela conversão levodopa-dopamina é um inibidor da atividade das DNMTs, podendo resultar em uma alteração nos padrões de metilação do DNA. COMT medeia ainda a conversão de dopamina em derivados O-metil (3-metoxitiramina), consumindo grupos metil de SAM. FONTE: HENDERSON-SMITH et al., 2019.

Além da L-DOPA, existem outras drogas que são comumente utilizadas no tratamento de DP: apomorfina e pergolide (agonistas nos receptores dopaminérgicos), entacapona (inibidor da catecol-O-metiltransferase) e selegilina (inibidor da monoamina oxidase) (RENANI et al., 2019).

Considerando os efeitos colaterais das drogas disponíveis e a busca por estratégias mais eficazes de combate a neurodegeneração e alívio dos sintomas, novos fármacos são constantemente testados. Uma das vias que tem recebido recente atenção é a via das quinureninas, visto que esta é ativada por citocinas pró-inflamatórias características da neuroinflamação, que pode desencadear ou agravar a doença (MOFFETT; NAMBOODIRI, 2003; ZINGER et al., 2011; SOUSA, DE et al., 2016; FUJIGAKI et al., 2017). Fármacos inibidores de enzimas fundamentais dessa via, tais como RO61-8048 e a nicotinilalanina, que atuam sob a enzima quinurenina 3-monooxigenase (KMO), responsável pela quebra da quinurenina em 3-hidroxiquinurenina (3-HK) e consequente formação de ácido quinolínico (AQ) (neurotóxico em grandes quantidades), podem ser uma boa alternativa de tratamento, podendo induzir o processamento da quinurenina pelas quinurenina aminotransferases (KATs), levando a formação de ácido quinurênico (QUINA), que possui um papel neuroprotetor¹⁰ (TAN et al., 2012).

Além do tratamento com drogas, a terapia gênica (TG) vem ganhando destaque. De maneira geral, um dos principais focos nas TGs para DP é a reposição enzimática na formação da dopamina, regulação de vias que foram descompensadas devida a falta da dopamina, e aumento na produção de fatores neuroprotetores, a fim de retardar a morte neuronal (FONTES, 2011).

A dietoterapia com o intuito de prevenir ou retardar os sintomas da DP vem ganhando adeptos. Alguns autores relatam que uma dieta cetogênica, ou seja, rica em lipídios (sejam eles na forma de óleos vegetais, animais ou de ácidos graxos) e pobre em carboidratos, podem prevenir doenças neurodegenerativas, visto que esses lipídios podem inibir a citotoxicidade induzida por estresse oxidativo, apoptose e inflamação (WŁODAREK, 2019; NURY et al., 2020). Porém, esse tipo de dieta deve ser usada com acompanhamento profissional, pois ocasiona uma redução do apetite,

¹⁰ A via do triptofano será detalhado no item 2.2.7 dessa tese.

podendo resultar em escassez de elementos nutricionais essenciais para demais processos fisiológicos (WŁODAREK, 2019). Além disso, dietas com restrição de proteínas também são utilizadas a fim de reduzir as flutuações motoras associadas ao uso contínuo de levodopa, embora também apresentem efeitos colaterais como a discinesia e precisem ser monitoradas (BARICHELLA et al., 2006; CEREDA et al., 2010; WANG et al., 2017).

Outra abordagem de tratamento na DP é a intervenção cirúrgica, que teve seu início na década de 60 (séc. XX). Nesta, os pacientes submetidos ao procedimento, recebiam lesões no tálamo (talamotomia) e no globo pálido (palidotomia), a fim de reduzir os tremores. Porém tais procedimentos tinham uma considerável taxa de morbidade e foram praticamente abandonados após a descoberta do tratamento com levodopa (FONTES, 2011; HAYES, 2019). Com as complicações decorrentes da terapêutica farmacológica e uma melhora nas ferramentas de imagem, a intervenção cirúrgica voltou a ser uma opção para alguns pacientes, em que os medicamentos não apresentam resultados efetivos e seus efeitos adversos impossibilitam o seu uso. Atualmente, a intervenção mais utilizada é a estimulação cerebral profunda (ECP), onde ocorre a implementação cirúrgica de um eletrodo na região cerebral em foco, que no caso da DP pode ser colocado no núcleo subtalâmico de *Luis*, glóbulo pálido ou no tálamo. Este eletrodo é conectado a um aparelho eletrônico implantado no tórax que gerará impulsos de frequência de aproximadamente 13Hz, estimulando as regiões cerebrais e reduzindo os sintomas de tremor, bradicinesia e rigidez (FONTES, 2011). As desvantagens dessa intervenção são os custos elevados, necessidade de ajustes periódicos e riscos eminentes presentes em cirurgias de grande porte, tais como infecções, hemorragias e mortalidade.

2.2.5 Genética

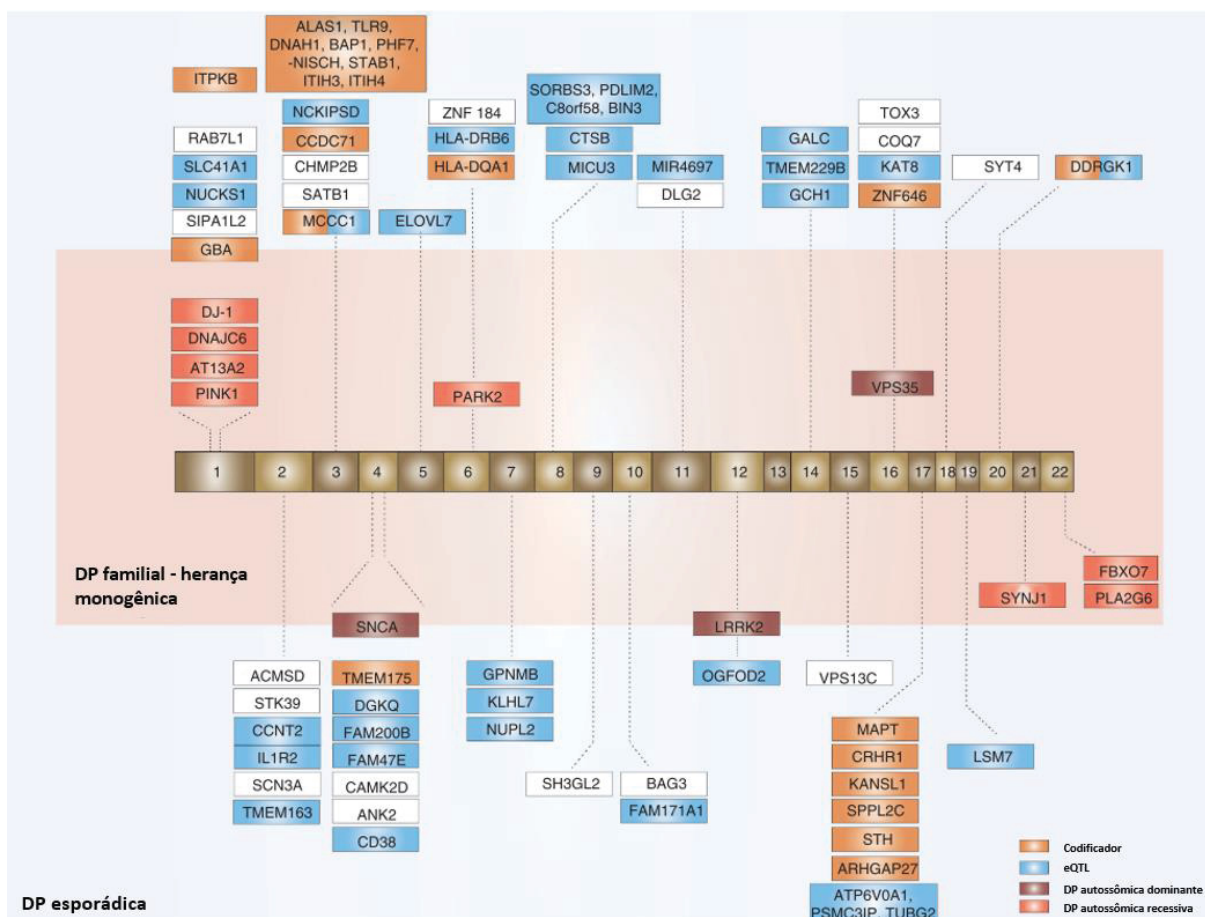
Em 1996, foi identificada a primeira mutação associada a DP, através de um estudo com uma grande família italiana, onde foi observado um padrão de agregação familiar relacionado com uma mutação no braço longo do cromossomo 4 (4q21 - q23) (POLYMERPOULOS et al., 1996). Posteriormente, a localização dessa mutação foi identificada como pertencente ao gene da α -sinucleína (POLYMERPOULOS et al., 1997), responsável pela codificação de uma proteína, que anos depois descobriu-se estar diretamente envolvida na patologia (IBÁÑEZ et al., 2004; PALS et al., 2004).

Porém, em estudos realizados com outras famílias nos anos posteriores, observou-se outras regiões cromossômicas associadas, não sendo relatado associações com a primeira mutação identificada, em grande parte das famílias analisadas (MUÑOZ et al., 1997; SCOTT et al., 1999). Dessa forma, ficou evidente que a DP é uma doença geneticamente heterogênea e complexa (KLEIN; WESTENBERGER, 2012).

Atualmente, sabemos que embora o surgimento da doença possa ocorrer pela herança mendeliana de algumas variantes gênicas, levando o surgimento da doença de forma precoce (antes dos 60 anos), a grande maioria dos casos são esporádicos e resultantes de uma complexa interação entre a genética do indivíduo e o ambiente.

Historicamente, os genes ou loci que eram identificados como ligados a DP recebiam o nome de “PARK” na ordem em que eram identificados, sendo que até o ano de 2016 somavam-se 23 PARKs (STOKER; GREENLAND, 2018). Porém, esse sistema de classificação apresentava várias inconsistências, como a ausência da replicação da associação de alguns loci em diferentes populações. Além disso, o gene causador não foi identificado para todos os loci, e nem todos os genes identificados apresentavam mutações causadoras ou determinantes da doença (KLEIN; WESTENBERGER, 2012). Muitas das mutações associadas a DP exibem penetrância incompleta ou variação na expressividade, mesmo se tratando de variantes monogênicas (OHNMACHT et al., 2020; BLAUWENDRAAT et al., 2020). Até 2018, foram identificados através de estudos GWAS, 41 loci gênicos como associados ao aumento do risco de desenvolvimento de DP, sendo que algumas dessas mutações são compartilhadas entre as formas familiares e esporádicas da doença (FIGURA 21). Vale ressaltar, que nas formas esporádicas, a DP é uma doença complexa, com influência genética e ambiental, e que desse modo possuir as variantes de susceptibilidade, não significa necessariamente o desenvolvimento da doença (HARDY, 2010; KLEIN; WESTENBERGER, 2012; DEXTER; JENNER, 2013; KORCZYN et al., 2017; HEESBEEN, VAN; SMIDT, 2019). A taxa de risco poligênico para DP apresenta um AUC entre 0,65 a 0,69, indicando o envolvimento não apenas genético, mas de fatores ambientais (BLAUWENDRAAT et al., 2020).

FIGURA 21 - ARQUITETURA GENÔMICA NA DP



FONTE: Adaptado de STOKER; GREENLAND, 2018.

2.2.6 Regulação epigenética

O termo “epigenética” foi proposto pela primeira vez em 1942 por Conrad Waddington, a fim de definir como as interações causais entre genes e seus produtos possibilitavam a expressão do fenótipo (WADDINGTON, 2012). Embora essa tenha sido a ideia inicial, ao longo dos anos seu significado sofreu diversas alterações, sendo que hoje, o mais aceito trata a epigenética como uma mudança fenotípica herdada devido a processos resultantes de mecanismos que controlam a expressão gênica, mas que não alteram a sequência do DNA (PORTELA; ESTELLER, 2010; TOLLEFSBOL, 2011).

Dentre os mecanismos de regulação epigenética mais conhecidos estão: a metilação do DNA¹¹, modificações de histonas e interferência por RNAs não codificantes¹².

A modificação de histonas pode resultar em uma alteração no posicionamento dos nucleossomos, permitindo ou não o acesso da maquinaria de transcrição a regiões promotoras dos genes. Nucleossomos são compostos por um octâmero de duas subunidades de cada uma das histonas H2A, H2B, H3 e H4, sendo que H2A e H2B se agrupam em dois dímeros e H3 e H4 formam um tetrâmero. Ao redor dessa estrutura, 146 pares de bases nucleotídicas contornam o conjunto de histonas em duas voltas, formando o nucleossomo (TOLLEFSBOL, 2011). Além das histonas mencionadas acima, ainda há a histona H1, que embora não participe do nucleossomo em si, se liga ao DNA que separa os dois complexos de histona, selando o nucleossomo no local em que o DNA entra e sai (DAUJAT et al., 2005). A porção amino-terminal das proteínas principais das histonas contém uma região da cauda flexível e altamente básica, estando sujeita a várias modificações pós-traducionais, sendo que a histona H3 apresenta a maior cauda, recebendo mais modificações que as demais (PORTELA; ESTELLER, 2010; TOLLEFSBOL, 2011) (FIGURA 21).

Dentre as principais modificações que podem ocorrer na cauda das histonas estão: acetilação (Ac) e a metilação (Me), embora ainda possa ocorrer fosforilação, ubiquitinação, sumorilação, citrulinação, ribosilação, isomerização de prolina e serotonilação. Tais modificações normalmente ocorrem nas lisinas (K), argininas (R) e serinas (S), e constituem o código de histonas, que podem levar a uma maior ou menor condensação do DNA através da sinalização e interação com proteínas específicas. É importante ressaltar que todas essas modificações são combinatórias e interdependentes levando a resultados celulares distintos e consistentes (TOLLEFSBOL, 2011; ZLOTORYNSKI, 2019).

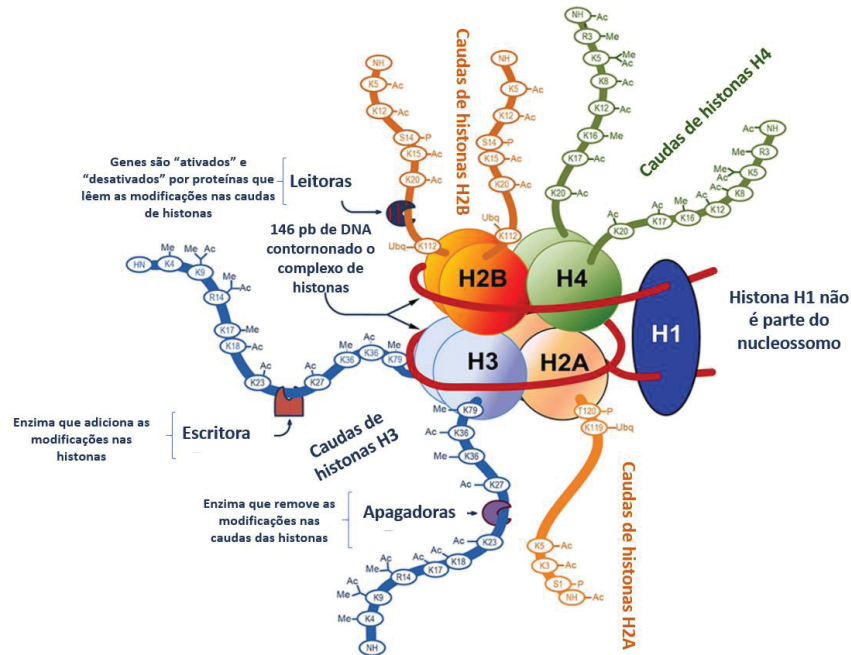
A acetilação e deacetilação das histonas se dá pela ação das histonas acetiltransferases (HAT) e histonas deacetilases (HDAC), respectivamente. A adição de um grupo acetil na lisina leva ao afrouxamento da conexão do octâmero de histonas, o que poderá resultar em uma ativação gênica. Já a metilação das histonas é feita pelas histonas metil transferases (HMTs) que podem metilar a lisina e a arginina

¹¹ Informações sobre a metilação e seu mecanismo será abordada no item 2.2.6.1 dessa tese.

¹² Informações sobre os RNAs não codificantes foram detalhados no item 2.1.5.3 dessa tese.

com até três grupos metil, podendo ser revertido pelas histonas demetilases (TOLLEFSBOL, 2011). O impacto da metilação de histonas na expressão gênica vai estar relacionada com qual histona, aminoácido e posição que ocorreu a metilação, podendo ser uma sinalização ativadora ou repressora da expressão gênica.

FIGURA 22 - COMPOSIÇÃO DE UM NUCLEOSSOMO HIPOTÉTICO COM MODIFICAÇÕES NAS CAUDAS DAS HISTONAS



As enzimas que modificam as caudas das histonas são indicadas na figura como *Writers* (“escritoras”) e *Erasers* (“apagadoras”), enquanto as proteínas *Readers* (“leitoras”) determinam o resultado funcional de modificações específicas. FONTE: Adaptado de REGNIER & KIM, 2018.

Quando os nucleossomos são compactados, ocorre a formação da heterocromatina, impossibilitando a transcrição gênica. Já quando esses estão descompactados, originam a eucromatina, e conseqüentemente permitem que uma série de processos celulares importantes ocorram, tais como a transcrição (ALLIS et al., 2015).

De maneira geral, desregulações nos padrões dos mecanismos epigenéticos podem resultar em diversos estados patológicos, sendo alvo de crescente interesse e pesquisa (PORTELA; ESTELLER, 2010). Em especial, o sistema nervoso central precisa ser cuidadosamente regulado, para que cumpra suas funções adequadamente. Neste sentido, já foram observadas várias alterações epigenéticas associadas a DP (TABELA 2).

TABELA 2 - EXEMPLOS DE MODIFICAÇÕES EPIGENÉTICAS RELATADAS EM DP.

Modificação epigenética	Locus	Possível função
Hipermetilação do DNA	<i>HLA-DQA1</i>	Envolvido na idade de início e estado da DP esporádica Desregulação na sinalização inflamatória
	<i>GFPT2</i>	
	<i>MAPT</i>	
	<i>PGC-1α</i>	
Metilação de mRNA	<i>KCNJ6</i>	Níveis aumentados de m ⁶ A (adenina metilada) desses mRNAs diretamente envolvidos na via de sinalização dopaminérgica, resultando em baixa expressão de proteínas
	<i>GRIN1</i>	
	<i>DRD3</i>	
Hipometilação do DNA	<i>VTRNA2-1</i>	Induz mudanças transcriptômicas sutis Citocina inflamatória que leva à morte de células dopaminérgicas em DP. Disfunção mitocondrial de α -sinucleína acumulada Desconhecido
	<i>TNF-α</i>	
	<i>SNCA</i>	
	<i>PARK2</i>	
Hipoacetilação	<i>Tyrosine Hydroxylase</i>	A enzima limitante da taxa na síntese de monoamina
	<i>PGC-1α</i>	Hipermetilação do promotor de <i>PGC-1α</i> na substância negra em DP esporádico
Hiperacetilação	<i>HLA-DPα1</i>	Presente na micróglia ativada
MicroRNA	<i>miR-133b</i>	Regula a maturidade e a função dos neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo
	<i>miR-132</i>	Redução em <i>Nurr1</i>
	<i>miR-124</i>	Envolvido na diferenciação de neurônios
	<i>miR7</i>	Regula os níveis de expressão da α -sinucleína
	<i>miR-106a</i>	
	<i>miR-34b</i>	Regula <i>Parkin</i> e <i>Dj1</i>
	<i>miR-34c</i>	
	<i>miR-494</i>	Regula <i>Dj1</i>
	<i>miR-21</i>	Regula a via de autofagia
	<i>miR-224</i>	
<i>miR-373</i>		
<i>miR-205</i>	Regula <i>LRRK2</i>	

Major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1 (HLA-DQA1); Glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 2 (GFPT2); Microtubule associated protein tau (MAPT); PPARG coactivator 1 alpha (PGC-1 α); Potassium inwardly rectifying channel subfamily J member 6 (KCNJ6); Glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 1 (GRIN1); Dopamine receptor D3 (DRD3); Vault RNA 2-1 (VTRNA2-1); Tumor necrosis factor alpha (TNF- α); Synuclein alpha (SNCA); Parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase (PARK2); FONTE: Adaptada de RENANI et al., 2019.

2.2.6.1 Metilação do DNA

A metilação do DNA é um dos mecanismos de regulação epigenética mais bem caracterizados (LARDENOIJE et al., 2015). O funcionamento adequado desse

processo é fundamental para a homeostase do organismo, visto que representa a memória celular dos padrões de expressão gênica (LI; ZHANG, 2014).

Em mamíferos, a metilação do DNA ocorre predominantemente em citosinas seguidas de guaninas (CpG), criando as 5-metilcitosinas (5mC). Recentemente, alguns estudos relataram metilações em adeninas (3mA) e guaninas (7mG), ou ao invés de uma CpG, uma citosina seguida de outra base nitrogenada CpH (H = A / C / T), que de maneira geral são muito mais raras (THOMAS et al., 2013; GUO et al., 2014; LI; ZHANG, 2014; LARDENOIJE et al., 2015).

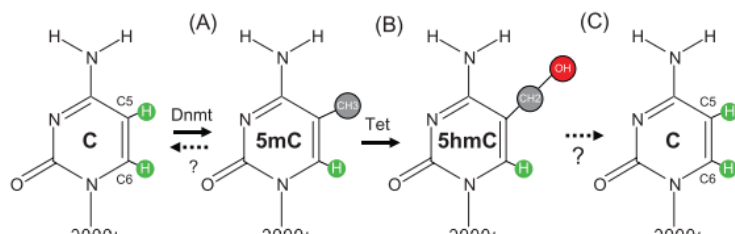
Durante a replicação ou reparo do DNA, os padrões de metilação podem ser copiados para o DNA nascente, graças a auto complementariedade dos dinucleotídeos CpG. Para tal, enzimas metiltransferases de manutenção (DNMT1) reconhecem quais CpG apresentam a metilação apenas na fita parental e realizam a metilação na fita recém sintetizada, exclusivamente para o CpG emparelhado com o CpG parental metilado, sendo esse processo chamado de metilação de manutenção (LI; ZHANG, 2014; LARDENOIJE et al., 2015). A metilação de CpGs também pode ocorrer *de novo*, ou seja, em CpGs que não apresentam a metilação originalmente, sendo feita por outras metiltransferases (DNMT3a e DNMT3b) (LARDENOIJE et al., 2015).

Existem quatro tipos principais de DNMTs que são estrutural e funcionalmente distintas: DNMT1, DNMT2, DNMT3a e DNMT3b. A DNMT1 atua exclusivamente na manutenção da metilação, como mencionado anteriormente, apresentando uma preferência de 30 a 40 vezes maior por locais hemimetilados e possuindo uma expressão maior em células em divisão (TOLLEFSBOL, 2011; LI; ZHANG, 2014). A DNMT2 atua como RNA metiltransferase, não se envolvendo diretamente com o processo de metilação do DNA (JURKOWSKI et al., 2008). As DNMT3a e DNMT3b são responsáveis pela metilação *de novo*, apresentando sua expressão de maneira mais específica de acordo com o tipo celular. Além disso, ainda participa desse processo como proteína reguladora a DNMT3-Like, que é muito similar a DNMT3a e DNMT3b, mas não possui a quantidade suficiente de resíduos conservados necessários para a atividade de DNMTase no domínio C-terminal (TOLLEFSBOL, 2011).

As DNMTs realizam a metilação das citosinas através da adição covalente de um grupo metil proveniente do S-adenosil metionina (SAM) ao carbono 5 da citosina

seguida de guanina (5' CpG 3'), levando a formação de 5-metilcitosina (5mC) (FIGURA 22). A SAM é proveniente de um complexo ciclo chamado ciclo do um carbono¹³

FIGURA 23 - METILAÇÃO, HIDROXILAÇÃO E DESMETILAÇÃO DA CITOSINA NO DNA

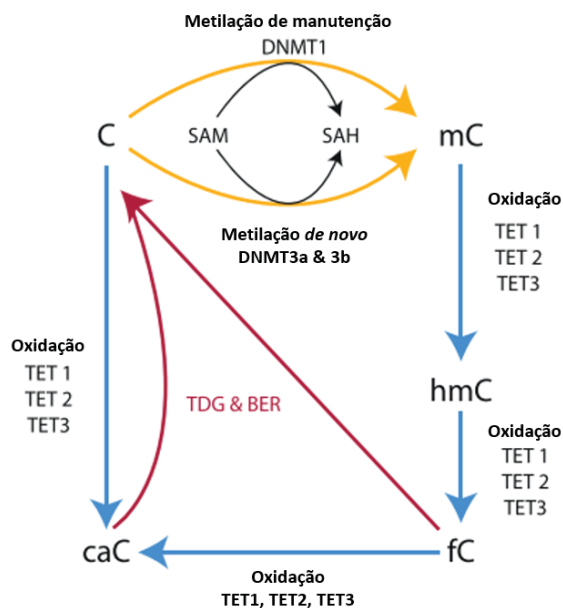


A - O ponto de interrogação indica possível atividade das DNA demetilases. **B** - Conversão de 5mC em 5hmC no DNA pela TET (*Tem Eleven Translocation*). **C** - Não se sabe se 5hmC é um produto final ou um intermediário na desmetilação do DNA ativo. FONTE: TOLLEFSBOL, 2011.

A desmetilação do DNA pode ocorrer de forma passiva através de um erro ocorrido no processo de manutenção da metilação durante a replicação, por desaminação da 5mC transformando-a em uma timina ou por erros de reparo do genoma em regiões que continha 5mCs. Além da forma espontânea, a desmetilação também pode ocorrer por intervenção enzimática das 5-mC dioxigenases (enzimas de translocação dez-onze - TET 1-3) que oxidam o grupo metil da 5mC, tornando-a em citosina 5-hidroximetil (5hmC) (UNNIKRISHNAN et al., 2019). Posteriormente, as 5hmC podem sofrer uma nova oxidação pelas TETs, resultando em 5-formilcitosina e 5-carboxilcitosina, que serão excisadas pela via de reparo de bases do DNA. A 5hmC também pode ser desaminada pela citosina desaminase, resultando em 5-hidroximetiluracil; sendo também posteriormente removida e substituída por uma citosina não metilada pela via de reparo por excisão de base (FIGURA 23) (UNNIKRISHNAN et al., 2019). No caso da 5hmC permanecer sem uma nova oxidação pelas TETs, ela pode levar a alteração no padrão de metilação, pois não será reconhecida pela DNMT1 no próximo ciclo de replicação, consequentemente não tendo a citosina metilada no DNA nascente (LI; ZHANG, 2014).

¹³ O ciclo do um carbono será abordado em detalhes no item 2.2.6.1.1 dessa tese.

FIGURA 24 - PROCESSO DE METILAÇÃO DO DNA



O esquema mostra as etapas envolvidas na formação e eliminação de 5-metil citosina (mC) no DNA. Abreviaturas: SAM - S-adenosilmetionina; SAH - S-adenosil homocisteína; hmC - 5-hidroximetil citosina; fC - 5-formil citosina; caC - 5-carboxil citosina; BER - reparo por excisão de base; TDG - timidina DNA glicosilase. FONTE: Adaptado de UNNIKISHNAN et al., 2019.

Inicialmente, a 5hmC foi considerada apenas como um intermediário na via de desmetilação ativa por TET, porém não foi verificado posteriormente uma correlação entre os níveis aumentados de 5hmC e a diminuição dos níveis de 5mC (KLEIN; JAGER, DE, 2016). Em um estudo feito durante a neurogênese em cérebro embrionário de camundongos, observou-se que nas células neuronais, a 5hmC encontra-se preferencialmente distribuída ao longo do corpo do gene e não em regiões potenciadoras, além de estar associada com modificações específicas nas histonas (HAHN et al., 2013). No cérebro humano, a 5hmC encontra-se enriquecida, particularmente em neurônios, sendo encontrada em sua maioria, no corpo de genes ativos, estando relacionada com aumento da atividade gênica. Isso indica que 5hmC, ao contrário do que se pensava, pode também ser uma marca epigenética estável (KLEIN; JAGER, DE, 2016). Em estudo recente, foi analisado através de imunohistoquímica, a presença de 5mC e 5hmC na substância *nigra* e cerebelo de pacientes de DP. Nos neurônios dopaminérgicos, observou-se níveis inalterados de imunorreatividade a 5-mC e 5-hmC, não apresentando diferenças significativa, em contraste com a região da substância branca cerebelar, que teve um aumento na presença de 5hmC (KAUT et al., 2019).

O efeito na expressão gênica ocasionado pela metilação do DNA sofre variações de acordo com o local onde ela ocorre. Quando em regiões promotoras de genes, de maneira geral, a metilação está associada com a repressão transcricional, porém quando ocorre ao longo da sequência gênica, ela pode estar facilitando a ocorrência de *splicing* (processamento de pré-mRNA) alternativo (LARDENOIJE et al., 2015; UNNIKRISHNAN et al., 2019). Nas regiões promotoras, a metilação do DNA pode interromper diretamente o processo de transcrição, interferindo na ligação dos fatores transcricionais, além de poder recrutar proteínas do domínio de ligação a metil-CpG (MBD), ativando a modificação subsequente da cauda de histonas, acarretando na compactação da cromatina (PORTELA; ESTELLER, 2010; LI; ZHANG, 2014; LARDENOIJE et al., 2015; UNNIKRISHNAN et al., 2019).

Considerando a importância da regulação de todo o processo de metilação e suas consequências a níveis de expressão gênica para o organismo, torna-se evidente que a ocorrência de uma instabilidade nesse mecanismo poderá ocasionar um estado patológico. Durante o envelhecimento, os padrões de metilação são alterados de maneira global no organismo, resultando em uma desregulação epigenética, especialmente no cérebro. Sítios CpG que anteriormente eram metilados, passam a ser hipometilados, e da mesma maneira, sítios não metilados passam a ser hipermetilados (KLEIN; JAGER, DE, 2016).

Na DP, já foram observadas diversas alterações no padrão de metilação de genes associados com a doença, envolvendo a hipermetilação de *HLA-DQA1*, *GFPT2*, *MAPT* e *PGC-1 α* , e a hipometilação de *SNCA*, *PARK2*, *TNF- α* ; *VTRNA2-1* (PIEPER et al., 2008; MASLIAH et al., 2013; MINONES-MOYANO et al., 2013; COUPLAND et al., 2014; SU et al., 2015; ERYILMAZ et al., 2017). Um dos genes mais estudados nesse contexto é o *SNCA*, visto que esse codifica para a proteína α -sinucleína, componente principal dos corpos de Lewy e um dos marcadores da DP. Já foi demonstrado que na DP esse gene está hipometilado, correlacionando com o aumento da expressão da α -sinucleína (GUHATHAKURTA et al., 2017).

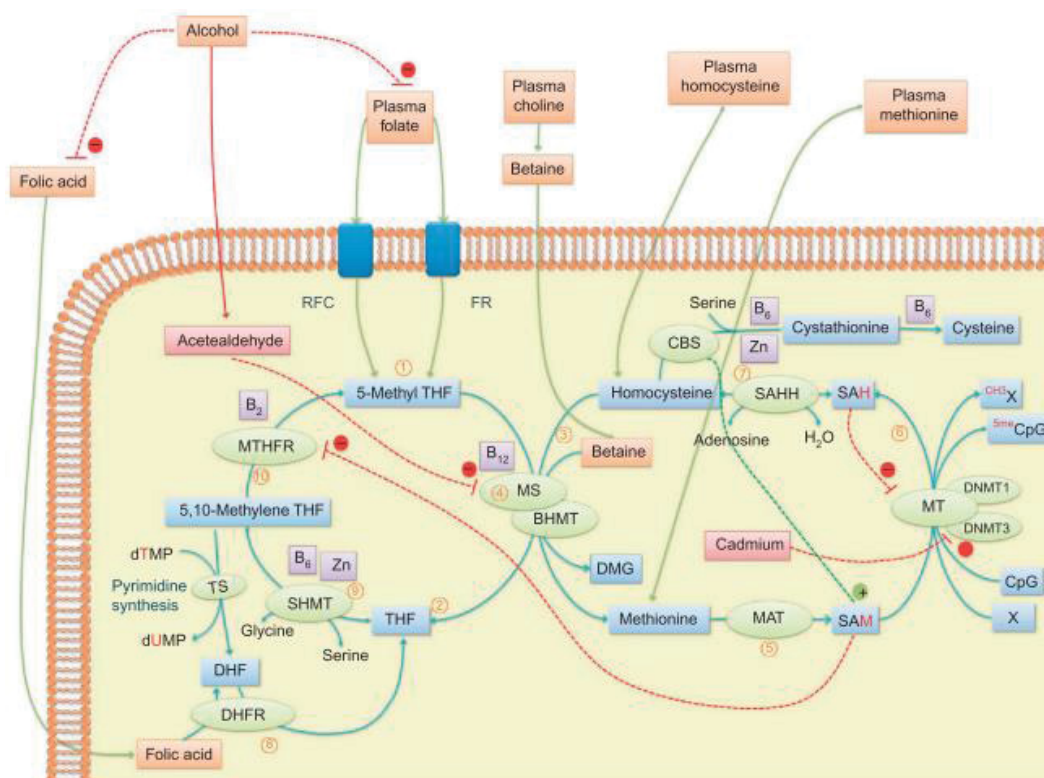
2.2.6.1.1 O ciclo do um carbono

Diversos processos biológicos são dependentes da transferência de grupos metil para operar corretamente, como por exemplo a síntese e metilação de nucleotídeos de DNA. Para tal, a produção de doadores metil deve ser eficiente, para

que não ocorra uma disfunção dos processos celulares fundamentais (TOLLEFSBOL, 2011).

SAM é a molécula precursora universal de grupos metil, sendo produzida através do metabolismo do um carbono, tornando-se matéria prima essencial para o processo de metilação do DNA (FIGURA 24) (TOLLEFSBOL, 2011). Para o correto funcionamento desse ciclo, são necessários grupos metil provenientes da dieta, enzimas específicas e cofatores associados.

FIGURA 25 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO METABOLISMO DO UM CARBONO



As linhas vermelhas tracejadas indicam a inibição das reações enzimáticas: o acetaldeído inibe diretamente o folato e a absorção do folato. Também diminui a regulação do MS. Alto nível de SAH desregula a atividade de MT. O aumento da concentração de SAM inibe a atividade de MTHFR, limitando a biodisponibilidade de 5-metil THF. O cádmio é um inibidor da atividade DNMT. A linha tracejada verde indica a regulação positiva de vias específicas. Todos os tecidos de mamíferos expressam MAT e MS, enquanto o BHMT é encontrado apenas no fígado e rim. SAM inibe MTHFR e MS e ativa CBS levando à canalização de homocisteína pela via de transulfuração. Abreviações: RFC - transportador de folato reduzido; FR - receptor de folato; THF - tetrahydrofolato; MS - metionina sintase; BHMT - betaína-homocisteína metiltransferase; DMG - dimetilglicina; MAT - metionina adenosiltransferase; SAM - S-adenosilmetionina; MT - metiltransferase; X - substratos para metilação; SAH - S-adenosil-homocisteína; CBS - cistationina beta-sintase; SHMT - serina hidroximetiltransferase; MTHFR - metileno THF redutase; DHF - dihydrofolato; TS - timidilato sintase.

FONTE: TOLLEFSBOL, 2011

Os principais doadores de grupos metil para a formação de SAM são os folatos, que podem ser ingeridos na dieta ou através de sua forma sintética (ácido fólico). Esses atuam como mediadores nas vias metabólicas do ciclo do um carbono, junto de outros cofatores, como por exemplo as vitaminas B2, B6 e B12 (TOLLEFSBOL, 2011).

O folato adquirido através da dieta, encontra-se disponível no plasma como metiltetrahidrofolato poliglutamato (metil-THF), que será transportado para o citoplasma celular, predominantemente pelo transportador de folato reduzido (RFC). Após o transporte, o metil-THF doa um grupo metil para a produção de tetra-hidrofolato (THF) que poderá servir como precursor da conversão de homocisteína em metionina. Esse processo é de suma importância, sendo catalisado pela metionina sintase (MS), que requer a presença de vitamina B12 como cofator. Caso ocorra um comprometimento nessa reação, os folatos permanecerão inutilizáveis, pois a MS é a única enzima que utiliza o metil-THF. A metionina é convertida em S-adenosil metionina (SAM) pela ação da metionina adenosiltransferase (MAT), sendo essa a via catabólica preferencial da metionina no fígado. O SAM poderá ser utilizado em inúmeros processos celulares, nos quais se faz necessária a doação de grupos metil, tais como a metilação do DNA. Invariavelmente, essas reações resultarão na conversão de SAM em S-adenosil-homocisteína (SAH), que é um potente inibidor competitivo de SAM nas reações de transmetilações, sendo fundamental sua remoção. Tal reação ocorre pela SAH hidrolase (SAHH) que metaboliza SAH em homocisteína.

Quando o folato é adquirido através da sua forma sintética, ele deve ser primeiramente reduzido para poder entrar no ciclo do um carbono. Esse processo ocorre pela ação da dihidrofolato redutase (DHFR), formando o di-hidrofolato (DHF) e posteriormente o THF. Quando formado por essa via, o THF é catabolizado em 5,10-metil THF pela ação da serina hidroximetiltransferase (SHMT) e do cofator vitamina B6, convertendo a serina em glicina. Posteriormente, esse subproduto é transformado em 5-metil THF pela ação do metileno THF redutase (MTHFR) que utiliza como cofator a vitamina B2.

A produção de SAM é dependente de uma complexa interação entre disponibilidade de cofator e substrato além da capacidade da atividade enzimática, sendo que essa, pode sofrer influência de variabilidade genética (TOLLEFSBOL, 2011). A homocisteína que é produzida pela hidrólise de SAH pela SAHH, é tóxica se

acumulada, podendo acarretar a hiperhomocisteinemia, que é um fator de risco para diversas doenças, inclusive as neurodegenerativas (FERREIRA, 2013; XIE et al., 2017). Por isso ela deve ser novamente metabolizada através de uma re-metilação, catalisada pela metionina sintase e seu cofator (vitamina B12) produzindo metionina, sendo então reciclada pela MTHFR. Alternativamente, a homocisteína pode passar por uma transsulfuração produzindo cisteína ou ser exportada para fluidos extracelulares. Além disso, as concentrações de homocisteína podem aumentar como resultado da deficiência em folato, vitamina B6 ou B12, ou relacionada com mutações genéticas em genes de enzimas redutases (*MTHFR* ou cistationina β -sintase) (FERREIRA, 2013).

2.2.7 A via do Triptofano¹⁴

O triptofano (TRP) é considerado um aminoácido essencial, não sendo sintetizado pelo nosso organismo e que precisa ser adquirido através da dieta (MAJEWSKI et al., 2016). Pode ser encontrado em diversos alimentos, tais como chocolate, ovos, peixes, legumes e carnes (CERVENKA et al., 2017).

A maior parte do TRP disponível no intestino é levado pela circulação sanguínea até o fígado, onde será metabolizado. Posteriormente, o TRP remanescente e seus subprodutos, serão distribuídos através da circulação periférica para os diversos tecidos (CERVENKA et al., 2017). Apenas uma pequena fração do triptofano é utilizado na produção de proteínas, sendo o restante majoritariamente metabolizado pela via do triptofano. Esta possui dois ramos de processamento distintos: a via da serotonina (5-HT), e a das quinureninas (KYNs), a qual corresponde ao processamento de cerca de 95 % do triptofano disponível (MÁNDI; VÉCSEI, 2012; VÉCSEI et al., 2013).

No ramo que leva a formação de 5-HT, o triptofano é hidrolisado pela triptofano hidroxilase (TPH) resultando em 5-hidroxitriptofano (5-HTP), que será metabolizado em 5-HT, e poderá ser armazenada em vesículas sinápticas,

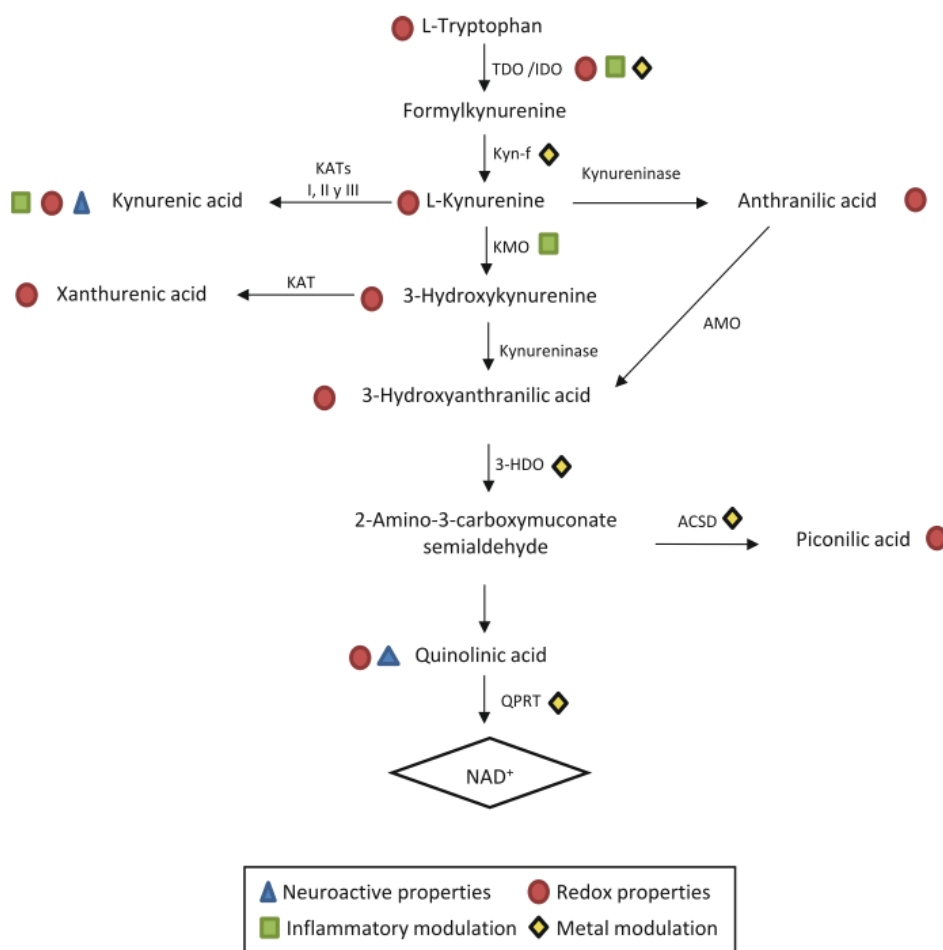
¹⁴ A siglas utilizadas para os elementos participantes da via encontram-se em inglês, pois a tradução em português, muitas vezes resulta na abreviação em inglês de outro metabólito participante via, podendo gerar equívocos. Para a tradução das siglas em português e inglês, consultar a seção de abreviações dessa tese.

metabolizada em 5-hidroxi-indoleacético (5-HIAA) ou em melatonina (E CARVALHO et al., 2017).

Quando processado pelo ramo das KYNs (FIGURA 25), o triptofano pode ser catabolizado em formilquinurenina pela ação da indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO) ou da triptofano 2,3-dioxigenase (TDO). No fígado, essa catálise ocorre por meio da TDO, enquanto nos demais órgãos, pelas IDO (E CARVALHO et al., 2017). Posteriormente a formilquinurenina é metabolizada pela formamidase, resultando em quinurenina (KYN), que poderá ser catabolizada por três diferentes enzimas, que levam a diferentes rotas.

Quando processada pela quinureninase (KYNU), que utiliza de piridoxina (vitamina B6) como cofator, a KYN dará origem ao ácido antranílico (AA), que poderá servir como precursor da formação do ácido 3-hidroxi-antranílico (3-HANA), principalmente no cérebro (BARAN; SCHWARCZ, 1990; SCHWARCZ et al., 2012). No entanto, se KYN for processada pelas quinurenina aminotransferases (KATs), que assim como a KYNU, necessita de vitamina B6 como cofator, haverá a formação de ácido quinurênico (KYNA), que poderá sofrer uma reação espontânea, originando ácido quinaldico (HAVELUND et al., 2017). E como última rota de processamento, KYN poderá ser catabolizada pela quinurenina 3-monoxigenase (KMO), que utiliza como cofator a riboflavina (vitamina B2), resultando em 3-hidroxiquinurenina (3-HK), o qual poderá ser metabolizado pelas KATs em ácido xanturênico (XA), ou pela KYNU, originando o 3-HANA. Esta, poderá ser oxidada em ácido cinabárico ou servir de substrato para a 3-hidroxi-antranílico-3,4-dioxigenase (3-HAO) resultando em semi-aldeído 2-aminocarboximucônico (ACS), o qual poderá sofrer uma reação espontânea originando o ácido quinolínico (QUIN), que servirá de substrato para a quinolinato fosforibosil transferase (QPRT) levando a formação de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NAD⁺). Ainda, o ACS poderá ser processado pela descarboxilase 2-amino-3-carboximucônico-6-semialdeído (ASD), resultando em semialdeído-2-aminomucônico (AS) que através de uma reação não enzimática, originará o ácido picolínico (SCHWARCZ et al., 2012; VÉCSEI et al., 2013; SCHWARCZ; STONE, 2017). Todos os metabólitos gerados na via da KYNs são chamados de maneira geral de quinureninas (MÁNDI; VÉCSEI, 2012).

FIGURA 26 - VIA DAS QUINURENINAS



FONTE: MITTAL, 2015.

Apenas TRP, KYN e 3-HK são capazes de transpassar a barreira hematoencefálica (BHE), sendo esses automaticamente absorvidos pelas células da glia (MADDISON; GIORGINI, 2015; E CARVALHO et al., 2017). Sendo assim, 40% da KYN é gerada no local e 60% é proveniente do sangue (VÉCSEI et al., 2013).

A expressão da via das KYNs no cérebro ainda não está completamente elucidada, visto que, embora as enzimas envolvidas na via sejam completamente expressas em células da linhagem monocítica (macrófagos e a micróglia), em demais células (astrócitos, neurônios, oligodendrócitos e células endoteliais) elas são parcialmente expressas, resultando na presença diferencial de certos metabólitos entre as células (LIM et al., 2017). A exemplo disso, a síntese de QUIN e KYNA são espacialmente separados, já que KYNA é produzida por astrócitos, enquanto QUIN é sintetizada na micróglia ativada e em macrófagos infiltrados (MADDISON; GIORGINI, 2015; LIM et al., 2017).

Os diversos metabólitos originados na via das KYNs, podem apresentar efeitos neurotóxico, neuroprotetor ou imunomodulador (LIM et al., 2017). KYN tem sido utilizada como um biomarcador para diversas doenças neurológicas (FUJIGAKI et al., 2017). Alguns estudos em modelos, relatam que além de ter um papel como substrato para metabolização na via, KYN apresenta um papel fisiológico, com propriedades neuroativas (pró e antioxidantes), embora sua atuação *in vivo* no SNC, ainda precisa ser elucidada (SONG et al., 2011; REYES OCAMPO et al., 2014; FUJIGAKI et al., 2017).

KYNA age como um antagonista do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), possuindo um papel neuroprotetor e anti-excitotóxico endógeno na modulação da neurotransmissão glutamatérgica, protegendo contra danos neuronais causados por QUIN, visto que esse é um agonista do mesmo receptor (MADDISON; GIORGINI, 2015). Porém, em caso de acúmulo anormal de KYNA no SNC, este poderá induzir um hipo-funcionamento glutamatérgico, perturbando a função cognitiva (OLNEY et al., 1991). Além disso, KYNA também é um antagonista do receptor α -7-nicotínico de acetilcolina (α 7nAChR), sendo que caso haja acúmulo de KYNA, esse poderá suprimir a função desse receptor, induzindo um bloqueio sensorial auditivo (SHEPARD et al., 2003).

3-HK é caracterizado com um metabólito tóxico capaz de induzir o dano oxidativo, através de sua interação com a xantina oxidase (XO), levando a produção de EROs e induzindo a clivagem do DNA nuclear, resultando em apoptose (OKUDA et al., 1998; E CARVALHO et al., 2017). Porém, alguns estudos mencionam que a toxicidade do 3-HK não está apenas relacionada com a produção de EROs, mas também com o comprometimento do metabolismo da energia celular (REYES OCAMPO et al., 2014). Mais estudos são necessários a fim de elucidar o mecanismo de toxicidade desse metabólito (FUJIGAKI et al., 2017).

QUIN é um metabólito neurotóxico, agonista dos receptores NMDA, levando a uma atividade exacerbada dos neurônios, podendo levar a danos neuronais. Além disso, QUIN pode gerar o estresse oxidativo e a liberação de radicais livres, independentemente de sua interação com os receptores NMDA. Dessa maneira, níveis elevados de QUIN são biomarcadores de doenças neurológicas inflamatórias, associadas à ativação do metabolismo das KYNs (FUJIGAKI et al., 2017).

O processo inflamatório induz as enzimas da via das KYNs (MOFFETT; NAMBOODIRI, 2003; MÁNDI; VÉCSEI, 2012; FUJIGAKI et al., 2017). IDO1 é a

principal responsável pela metabolização do triptofano no cérebro. Sua expressão e atividade é induzida por interferons (IFNs), especialmente o INF- γ , TNF- α , receptores Toll (TLRs 1-6 e 9), lipopolissacarídeos (LPS), proteínas virais e amiloide (LIM et al., 2017). Além disso, sua expressão também é aumentada por várias outras citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6 e IL-1 β . Outras enzimas participantes da via, como a KMO, também podem ser estimuladas por mediadores inflamatórios, resultando em um aumento de 3-HK e QUIN, que são neurotóxicos em alta concentração (FUJIGAKI et al., 2017).

2.2.7.1 O envolvimento das KYNs na Doença de Parkinson

A via das quinureninas é um dos principais mecanismos reguladores da resposta imune (MOFFETT; NAMBOODIRI, 2003), estando envolvida em diversas doenças neuroinflamatórias e degenerativas, tais como DA, DP, Doença de Huntington (DH), Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) e Esclerose Múltipla (EM) (BEAL et al., 1990; GUILLEMIN; BREW, 2002; GUILLEMIN et al., 2006; RAJDA et al., 2007).

O primeiro relato do envolvimento da via das KYNs em DP ocorreu por Ogawa e colaboradores (1992), que verificou um aumento significativo das razões TRP / KYN e KYNA / TRP nas regiões do córtex frontal, putâmen e SNpc, além de níveis mais elevados de 3-HK no putâmen e SNpc desses pacientes de DP. Posteriormente, alguns estudos de metabolomas foram desenvolvidos com pacientes de DP e observaram níveis mais elevados de 3-HK no líquido cefalorraquidiano (LCR) (LEWITT et al., 2013), mas o mesmo não foi observado no plasma (CHANG et al., 2018). Fagotti e colaboradores (2019) realizaram uma análise de metaboloma em amostras de plasma e regiões cerebrais (SNpc, estriado e hipocampo) de ratos induzidos ao Parkinson por rotenona, e encontraram no plasma desses animais, níveis mais elevados de KYN.

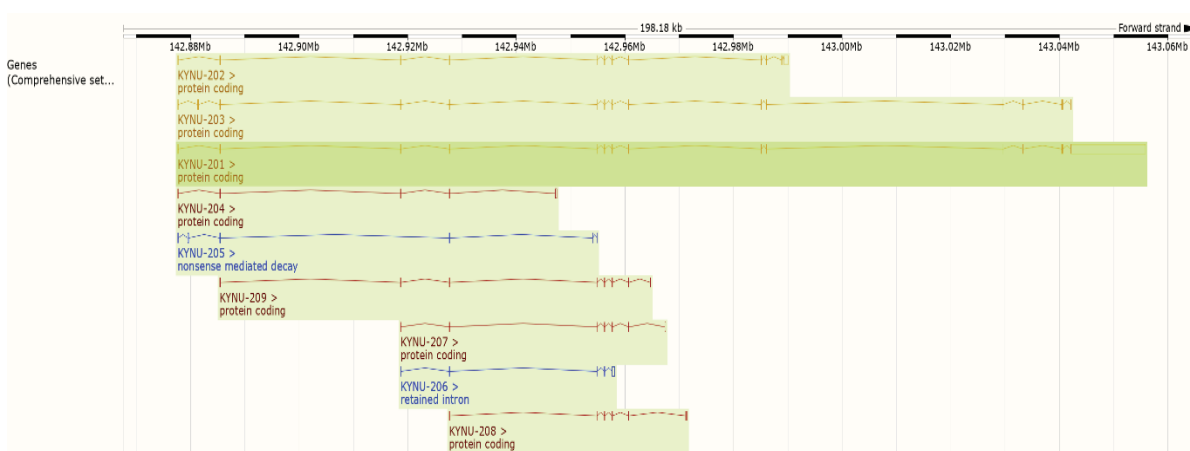
Ao que tudo indica, algumas KYNs são fortes candidatas como biomarcadores da doença de Parkinson.

2.2.7.2 Gene *KYNU*

2.2.7.2.1 Estrutura e regulação

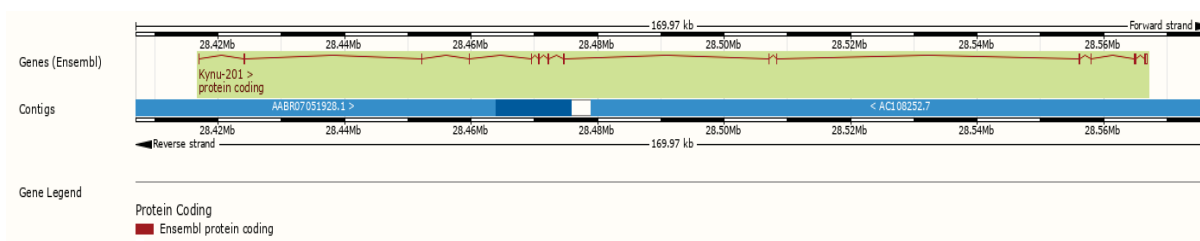
Em humanos, o gene *KYNU* (OMIM: 605197) está localizado no braço longo do cromossomo 2 (Chr:2:142,877,657-143,055,833 / GRCh38). Possui nove transcritos, sendo sete deles codificadores de proteína, um com intron retido e outro submetido a decaimento mediado por nonsense. Pode apresentar até 15 exons, de acordo com o transcrito analisado (Ensembl, 2020) (FIGURA 26). Em ratos, *Kynu* se localiza no cromossomo 3 (Chr3: 28,416,954-28,566,928 / RGSC 6.0/rn6) e possui apenas um transcrito codificante com 14 exons (FIGURA 27).

FIGURA 27 - TRANSCRITOS DO GENE *KYNU* EM HUMANOS



Em vermelho: transcrito codificador de proteína (Ensembl); em amarelo: transcrito codificador de proteína (Ensembl + Havana); Em azul: transcritos processados, mas que não codificam proteína. Navegador genômico Ensembl. Disponível em: <<http://twixar.me/HnqT>> Acesso em: 04/05/2020.

FIGURA 28 - TRANSCRITO DO GENE *Kynu* EM RATOS (*Rattus norvegicus*)



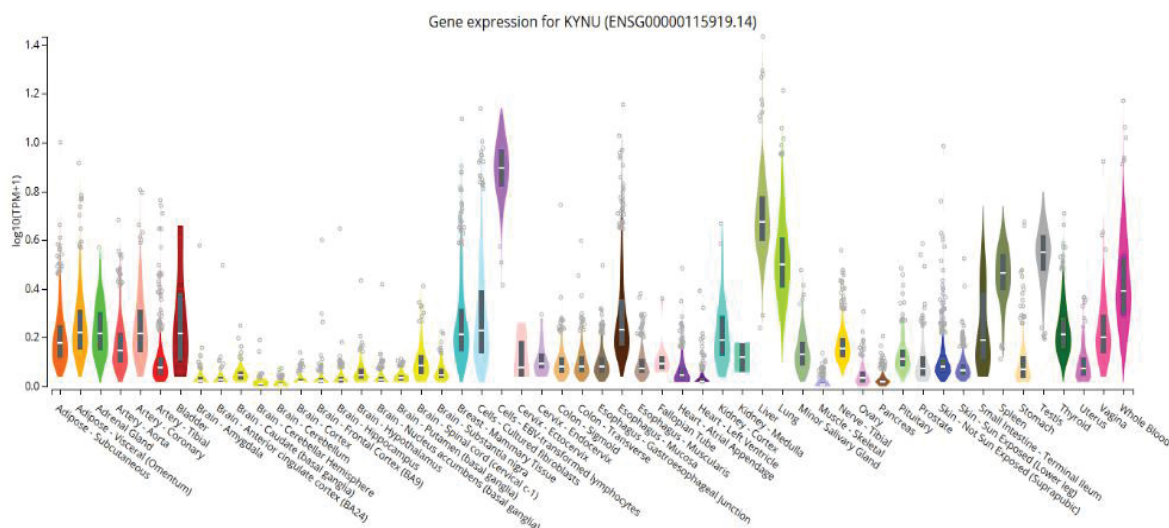
FONTE: Navegador genômico Ensembl. Disponível em: <<http://twixar.me/nvqT>> Acesso em: 04/05/2020.

Tanto em ratos quanto em humanos, o gene não possui ilhas CpGs em sua região promotora, podendo ser classificado como um gene com promotor de baixo CpG (LCP do inglês *Low CpG promoter*) (HARTUNG et al., 2012). Dessa forma, possivelmente sua regulação ocorra por fatores transcricionais e demais proteínas reguladoras. Segundo o navegador miRDB, existem 34 possíveis miRNA que podem

interagir e influenciar na regulação do gene (miRDB, Disponível em: <<http://twixar.me/PvqT>> Acesso em: 05/05/2020).

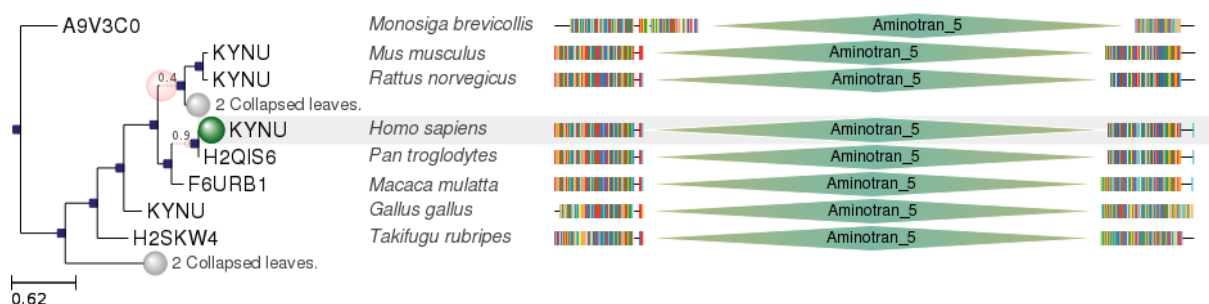
A expressão gênica de *KYNU* ocorre em todos os tecidos do organismo, sendo mais expresso em linfócitos transformados com vírus *Epstein-Barr* (VEB) e no fígado. No cérebro possui expressão relativamente baixa, porém ocorre em todas as regiões analisadas (GTEx Portal, 2020) (FIGURA 28). O gene em humanos e ratos são ortólogos, apresentando identidade de sequência de 84,70% entre si (Ensembl, Disponível em: <<http://twixar.me/wFqT>>. Acesso em 05/05/2020) (FIGURA 29).

FIGURA 29 - EXPRESSÃO DO GENE *KYNU* EM TECIDOS HUMANOS.



FONTE: GTEx Portal. Disponível em: <<http://twixar.me/vWqT>> Acesso em: 05/05/2020.

FIGURA 30 - IDENTIDADE DE SEQUÊNCIA DO GENE *KYNU* ENTRE HUMANOS E RATOS



Assinalado com o círculo verde encontra-se a sequência do gene *KYNU* em humanos. Logo acima, encontra-se a sequência para ratos. FONTE: DB phylome. Disponível em: <http://twixar.me/4FqT>. Acesso em: 05/05/2020.

Em humanos, *KYNU* já teve alguns polimorfismos associados com acidúria xanturênica (rs606231307 - A>G / p.*Thr198Ala*) (CHRISTENSEN et al., 2007), hipertensão (rs9013 - A>G / p.*Lys412Glu*), redução da atividade enzimática em 50%

(rs2304705 - G>A / p.Arg188Gln) (ZHANG et al., 2011) e deficiência de NAD (SHI et al., 2017).

2.2.7.2.2 A quinureninase (KYNU)

A descoberta da KYNU ocorreu em 1925 por Matsuoka e Yoshimatsu, que a observaram em urina de coelhos alimentados com uma dieta rica em triptofano (PHILLIPS, 2014). KYNU (UniProt: Q16719 em humanos e P70712 em ratos) pertence a superfamília de aminotransferases e utiliza como cofator a vitamina B6 (PHILLIPS, 2014). Sua estrutura foi determinada pela primeira vez em 2007 (LIMA et al., 2007), sendo uma grande proteína homodímera, composta por 465/464 aminoácidos (humanos / ratos) e de peso molecular superior a 52kDa (BOROS et al., 2018) (FIGURA 30).

KYNU pode catalisar a quinurenina (KYN) e a 3-hidroxiquinurenina (3-HK), resultando em ácido antranílico (AA) e ácido 3-hidroxi-antranílico (3-HANA) respectivamente, porém em eucariotos, apresenta uma maior afinidade a 3-HK (LIMA et al., 2007).

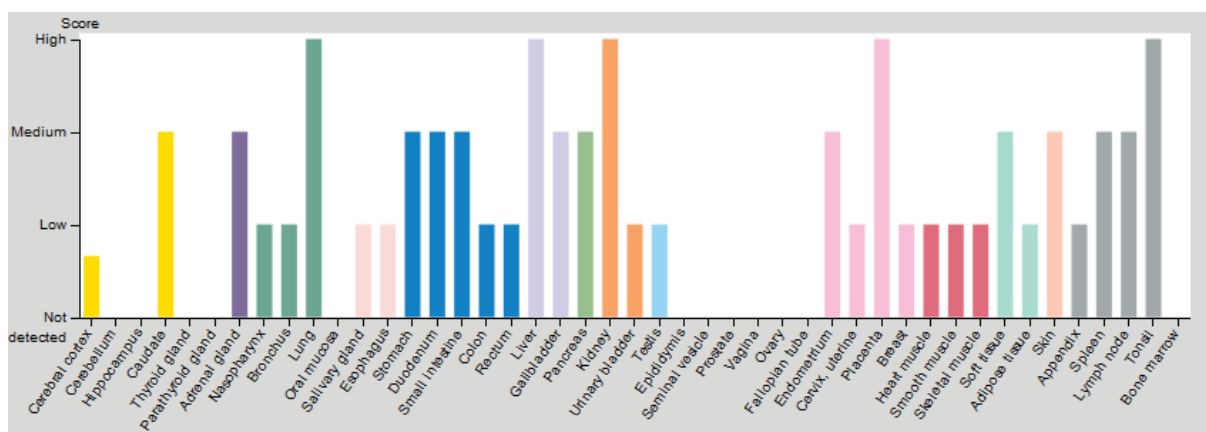
A expressão de KYNU foi observada em todos os tecidos testados, apresentando altos níveis na placenta, fígado e pulmão. É expressa em todas as regiões do cérebro que foram analisadas. (BATEMAN et al., 2017; FUJIGAKI et al., 2017) (FIGURA 31).

FIGURA 31 – ESTRUTURA EM 3D DA KYNU EM HUMANOS



FONTE: UniProt. Disponível em: <<http://twixar.me/29qT>>. Acesso em: 06/05/2020.

FIGURA 32 - EXPRESSÃO DE KYNU EM DIFERENTES TECIDOS



FONTE: The Human Protein Atlas. Disponível em: < <http://twixar.me/H9qT>>. Acesso em: 06/05/2020.

2.3 SOBREPOSIÇÃO ENTRE DA E DP

A DA e DP apresentam algumas características fisiopatológicas em comum, instigando estudos mais aprofundados com o intuito de elucidar a relação entre as duas doenças.

A incidência de DA e DP esporádicas é intimamente relacionada com o aumento da idade. Além disso, apresentam o acúmulo de proteínas agregadas como biomarcadores neuropatológicos (α -sinucleína em DP e β -amiloide em DA). A α -sinucleína, já foi encontrada como um componente não-amiloide dentro das placas β -amiloides observadas em DA, além de mais de 60% dos casos de DA apresentarem a formação de corpos de Lewy (revisto por KELLY et al., 2019). Estudos mostram que tais doenças apresentam alguns de seus mecanismos moleculares comuns compartilhados, tais como a desregulação da homeostase do ferro, o estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e neuroinflamação (XIE, A. et al., 2014; KELLY et al., 2019). Além disso, as duas doenças apresentam alguns genes associados concomitantemente, tais como *PON1*, *GSTO*, *NEDD9*, *MAPT*, *ABCA7*, *LRRK2*, *APOE* (XIE, A. et al., 2014; DESIKAN et al., 2015; NUYTEMANS et al., 2016; ZHU et al., 2017; SUN et al., 2019).

De maneira geral, a demência pode ser ocasionada por diferentes mecanismos, sendo as doenças neurodegenerativas uma delas. Cerca de 80% dos pacientes de DP chegam a desenvolver quadro demencial, sintoma característico na DA (revisto por KELLY et al., 2019). Diferentes doenças neurodegenerativas podem levar a demência, sendo possível a coexistência dessas, tais como a DP e a DA (RAJPUT et al., 1993).

3 HIPÓTESE E JUSTIFICATIVA

Com o aumento da expectativa de vida da população, doenças associadas a idade têm se tornado um sério problema de saúde pública. Tanto DA, quanto DP, são as doenças neurodegenerativas mais frequentes na população. Embora ainda não possuam suas etiologias bem esclarecidas, a manifestação dessas são frequentemente associadas ao envelhecimento e possivelmente são decorrentes da interação entre fatores genéticos, epigenéticos e ambientais. Neste contexto, a investigação de polimorfismos genéticos, padrões da metilação do DNA e mecanismos imunológicos, associados a estas doenças, podem aumentar a compreensão da origem e desenvolvimento destes distúrbios.

Espera-se que os resultados deste trabalho conduzam a novas estratégias de saúde pública para prevenção e diagnóstico precoce, contribuindo para a elaboração de novas abordagens de tratamento.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Contribuir para a compreensão da patogênese das doenças de Alzheimer e Parkinson, através da investigação na população Sul-brasileira de variantes associadas com LOAD, e de produtos resultantes de processos inflamatórios, assim como compreender o papel da regulação epigenética para expressão do gene *KYNU* e sua importância na patologia da DP.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.2.1 Objetivos específicos para trabalhos desenvolvidos com a DA

- I. Replicar na população sul brasileira associações genéticas para LOAD previamente descritas por meio de estudos genômicos de associação em populações norte-americanas e europeias;
- II. Avaliar a associação de novos polimorfismos candidatos na população sul brasileira;
- III. Explorar o potencial funcional das variantes validadas através de análises *in silico*;
- IV. Avaliar a ocorrência e quantidade de NETs nas amostras de plasma de pacientes com LOAD;

4.2.2 Objetivos específicos para o trabalho desenvolvido com a DP

- V. Analisar se os padrões de metilação do gene *Kynu* na substância *nigra* e estriado do cérebro de modelo animal de DP (rotenona) são modificados pela suplementação com ácido fólico e vitamina B12;
- VI. Avaliar se existe associação entre os níveis de mRNA do gene *Kynu* e os padrões de metilação do gene na substância *nigra* e estriado do cérebro de modelo animal de DP;

- VII. Analisar os efeitos da suplementação com ácido fólico e vitamina B12 na expressão gênica de *Kynu* na substância *nigra* e estriado do cérebro de modelo animal de DP;
- VIII. Avaliar os efeitos da suplementação com ácido fólico e vitamina B12 no processo de consolidação da memória no modelo animal de DP;
- IX. Avaliar o envolvimento do gene *Kynu* na susceptibilidade a DP.

5 DESCRIÇÃO DOS CAPÍTULOS

Esta tese segue as normas da UFPR e encontra-se em formato de artigo, como permitido pelo Programa de Pós-Graduação em Genética dessa instituição. Dessa forma, está dividida em quatro capítulos, cada qual abrangendo um dos artigos produzidos ao longo do doutorado.

O primeiro capítulo corresponde ao artigo original já publicado no *Journal of Molecular Neuroscience* sob o título de *“First report of CR1 polymorphisms and soluble CR1 levels associated with Late Onset Alzheimer’s Disease (LOAD) in Latin america.”* Este artigo não é open-access e por isso não consta na íntegra nessa tese, mas possui o link de leitura permitido pela editora.

No segundo capítulo apresentamos o artigo *“GWAS-top polymorphisms associated with Late-Onset Alzheimer disease (LOAD) in Brazil: pointing out possible new culprits among noncoding RNAs”*. Consiste em um estudo de replicação na população Sul-brasileira de polimorfismos associados com LOAD em GWAS com euro-descendentes, com posterior investigação funcional *in silico* das variantes associadas.

O terceiro capítulo refere-se ao artigo *“Neutrophil extracellular traps: a perspective of neuroinflammation and complement activation in Alzheimer’s disease”*. Trata-se de um artigo de perspectiva sobre a formação de NETs na DA e a participação do sistema complemento no processo.

No último capítulo encontra-se o artigo *“Folic acid and vitamin B12 prevent deleterious effects on memory and Kynureninase expression in an animal model of Parkinson’s disease”*. Corresponde a um estudo com modelo animal (ratos induzidos ao Parkinson por rotenona), onde observamos os efeitos da suplementação com ácido fólico e vitamina B12 na regulação da metilação e expressão do gene *Kynu* (*Kynureninase*), assim como as possíveis consequências na memória desses animais.

6 CAPÍTULO 1 – CR1 E DA

PRIMEIRO ARTIGO ORIGINAL - Estudo de associação caso-controle. Publicado no periódico científico Journal of Molecular Neuroscience em 9 de maio de 2020[&]. O conteúdo do artigo não é de acesso livre e por esse motivo, não foi colocado na íntegra. A visualização do trabalho pode ocorrer através do link: <https://rdcu.be/b34HM>.

FIRST REPORT OF *CR1* POLYMORPHISMS AND SOLUBLE CR1 LEVELS ASSOCIATED WITH LATE ONSET ALZHEIMER'S DISEASE (LOAD) IN LATIN AMERICA

Gabriela Canalli Kretzschmar^{a#}; Angela Adriane Hanel Antoniazzi^{a#}; Luana Caroline Oliveira^a; Renato Mitsunori Nisihara^b; Maria Luiza Petzl-Erler^a; Ricardo Lehtonen R. de Souza^c; Angelica Beate Winter Boldt^{a,b}

^a Laboratory of Human Molecular Genetics, Department of Genetics, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil.

^b Laboratory of Molecular Immunopathology, Department of Clinical Pathology, Clinical Hospital, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil.

^c Polymorphism and Linkage Laboratory, Department of Genetics, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil.

both are first authors.

6.1 ABSTRACT

The *CR1* gene has been widely studied in Alzheimer's disease (AD), since its first association with the disease in 2009. Even after eleven years of this discovery, the role of this gene in AD has not yet been fully elucidated, and the association of its variants was not validated in Latin American populations. We genotyped five *CR1* single nucleotide polymorphisms (SNPs rs6656401, rs3849266, rs2274567, rs4844610, and rs12034383) in up to 162 AD patients and 137 controls through PCR-SSP and iPLEX MassARRAY Platform (Sequenom) and measured soluble CR1 (sCR1) levels in plasma of 40 AD patients and 39 controls with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Homozygosity for haplotype *rs3849266**C_*rs2274567**A (CA/CA genotype) was associated with susceptibility to AD (OR=2.94, p=0.018). Patients presented higher sCR1 levels in plasma than controls (p=0.038). Furthermore, patients that carry the *rs2274567**G allele (p.1208Arg) presented higher sCR1 levels than A/A (p.1208His/His) homozygotes (p=0.036). This is the first study to validate the association of *CR1* polymorphisms with late-onset Alzheimer's disease, as well as to evaluate sCR1 levels in a Latin American population. SNPs present in the regulatory and coding regions of this gene may be playing a key role in the observed association, probably by interfering in BA plaques clearance. Inhibition may be due to the increase in local sCR1 levels observed in patients, which may result from polymorphisms leading to larger isoforms of CR1 and / or structural alterations of the protein that makes it less functional, as well as increased vesiculation of the molecules.

KEYWORDS: sCR1, complement system, Alzheimer's Disease, complement receptor 1, *CR1*, polymorphisms.

& - Kretschmar, G.C., Antoniazzi, A.A.H., Oliveira, L.C. *et al.* First Report of *CR1* Polymorphisms and Soluble CR1 Levels Associated with Late Onset Alzheimer's Disease (LOAD) in Latin America. *J Mol Neurosci* (2020). <https://doi.org/10.1007/s12031-020-01547-2>

7 CAPÍTULO 2 – REPLICAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM DA

GWAS-TOP POLYMORPHISMS ASSOCIATED WITH LATE-ONSET ALZHEIMER DISEASE (LOAD) IN BRAZIL: POINTING OUT POSSIBLE NEW CULPRITS AMONG NONCODING RNAs

Gabriela Canalli Kretzschmar¹, Nina Moura Alencar¹, Saritha Suellen Lopes da Silva², Carla Daniela Sulzbach², Caroline Grisbach Meissner¹, Maria Luiza Petzl-Erler¹, Ricardo Lehtonen R. de Souza², Angelica Beate Winter Boldt^{1*}

¹ Laboratory of Human Molecular Genetics, Postgraduate Program in Genetics, Department of Genetics, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil.

² Laboratory of Polymorphism and Linkage, Postgraduate Program in Genetics, Department of Genetics, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil.

*** Correspondence:**

Profa. Dra. Angelica Beate Winter Boldt

E-mail: angelicaboldt@gmail.com

7.1 ABSTRACT

Several genome-wide association studies (GWAS) have been carried out with late-onset Alzheimer's disease (LOAD), mainly in European and Asian populations. Different polymorphisms were associated, but several of them without a functional explanation. GWAS are fundamental for identifying loci associated with diseases, although they often do not point to causal polymorphisms. In this sense, functional investigations are a fundamental tool for discover causality, although the failure of this validation does not necessarily indicate a non-causality. Furthermore, the allele frequency of associated genetic variants may vary widely between populations, requiring replication of these associations in other ethnicities. In this sense, our study sought to replicate in 150 AD patients and 114 elderly controls from the South Brazilian population, 18 single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with AD in European GWAS, with further functional investigation using bioinformatic tools for the associated SNPs. Of the 18 SNPs investigated, only four were associated in our population: rs769449 (*APOE*), rs10838725 (*CELF1*), rs6733839 and rs744373 (*BIN1-CYP27C1*). We identified 54 variants in linkage disequilibrium (LD) with the associated SNPs, most of which act as expression or splicing quantitative trait loci (eQTLs/sQTLs) in genes previously associated with AD or with a possible functional role in the disease, such as *CELF1*, *MADD*, *MYBPC3*, *NR1H3*, *NUP160*, *SPI1*, and *TOMM40*. Interestingly, eight of these variants are located within long noncoding RNAs (lncRNAs) genes that have not been previously investigated regarding AD. Some of these polymorphisms can result in changes of these lncRNA's secondary structure, leading to either loss or gain of micro-RNAs (miRNAs) binding sites, deregulating downstream pathways. Our pioneering work not only replicated LOAD association with polymorphisms not yet associated in the Brazilian population but also identified six possible lncRNAs that may interfere in LOAD development. The results lead us to emphasize the importance of functional exploration of associations found in large-scale association studies in different populations to embrace personalized and inclusive medicine in the future.

Keywords: Alzheimer's disease, GWAS, *APOE*, *BIN1*, *CELF1*, lncRNA.

7.2 INTRODUCTION

Late-onset Alzheimer's disease (LOAD) is a neurodegenerative disease responsible for most dementia cases worldwide in the elderly population (LANE et al., 2018). The neuropathological features are the accumulation of β -amyloid ($A\beta$) plaques and neurofibrillary tangles (NFT), leading to neuronal death and cerebral atrophy (BRAAK; BRAAK, 1991). LOAD is a complex disease, with the influence of several genetic factors, in addition to environmental factors. Although there are numerous studies on LOAD with the most diverse approaches, all the mechanisms of involved in this disease remains poorly understood.

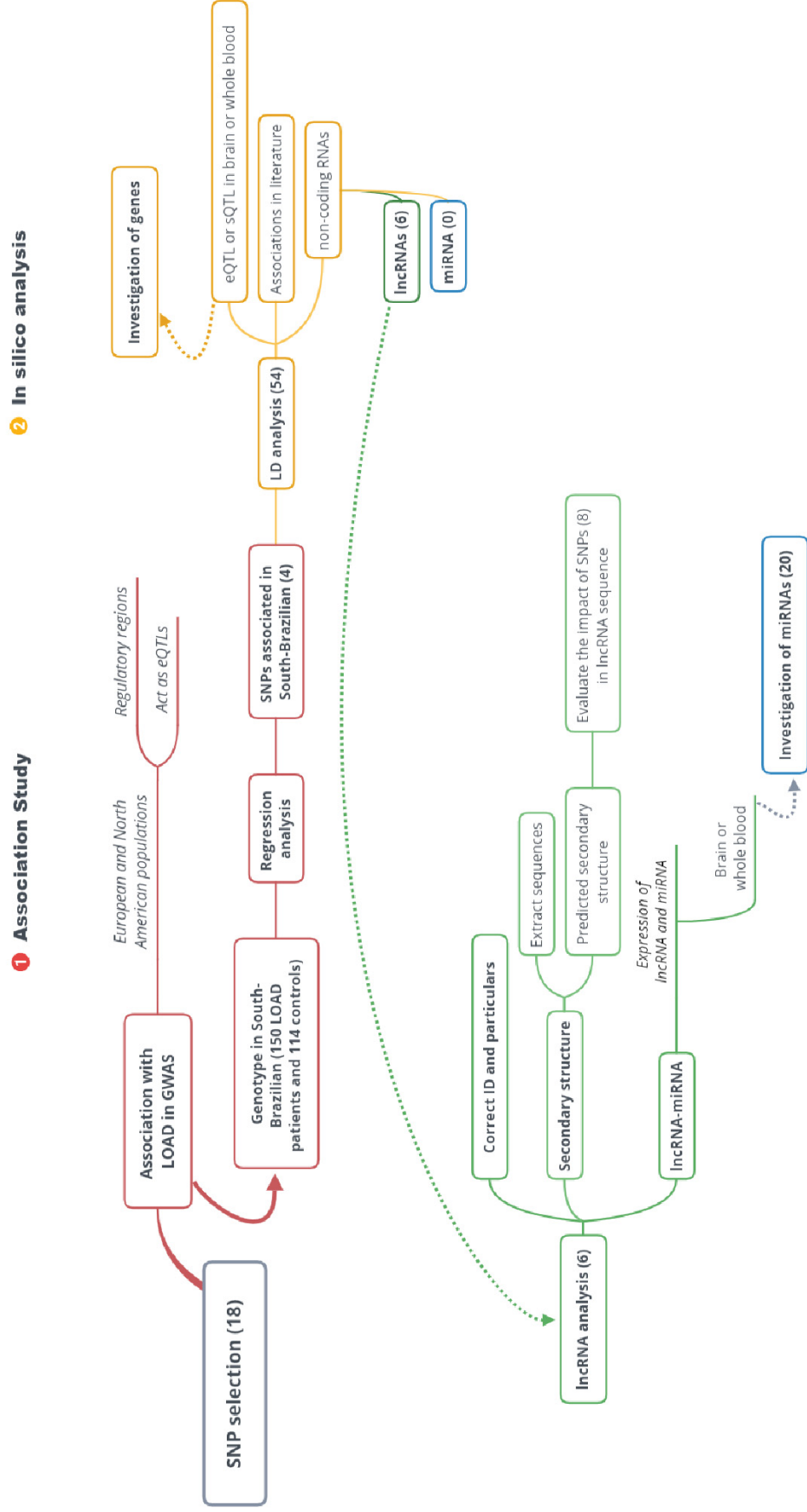
Genome-wide association studies (GWAS) started in 2006 and have grown exponentially in numbers (BUNIELLO et al., 2019), allowing the identification of countless genetic variants associated with diseases and phenotypic traits. However, most of them are not directly implicated in the phenotype, being markers in high linkage disequilibrium (LD) with the unknown regulatory or structural causal variant (MAURANO et al., 2012; ZHU et al., 2016). Besides, most GWAS were performed in European and Asian populations, hindering the extrapolation of results for populations of other or mixed ancestries, given the possible difference of gene or haplotype frequencies (NÉDÉLEC et al., 2016). Currently, over 90 GWAS have been performed with LOAD (GWAS catalog). They led to the identification of different polymorphisms, mostly in intronic or intergenic regions, possibly modulating the susceptibility to disease in the populations where they were analyzed, but most were not investigated nor replicated yet in Latin American populations (KRETZSCHMAR et al., 2020).

In this context, our study sought to replicated in the South-Brazilian population some associations of single nucleotide polymorphisms (SNPs) found associated with LOAD in GWAS performed in European-derived populations, as well as to evaluate possible functional explanations for these associations.

7.3 MATERIAL AND METHODS

To understand this work's multistep nature, we represented them as a two-stage workflow (Figure 1), showing first, the replication in patients from South Brazil of European-associated LOAD variants , followed by the in silico investigation of replicated associations.

Figure 1 – Workflow



This study was divided into two stages: 1- association study; 2- in silico analysis. Only the associated variables in the studied population (South Brazilian) followed in silico analysis. SNP - single nucleotide polymorphisms; LOAD - Late-onset Alzheimer’s Disease; GWAS - Genome-Wide Association Studies; eQTL - Expression quantitative trait locus; sQTL - Splicing quantitative trait locus; LD - Linkage disequilibrium; lncRNAs – long noncoding RNAs; miRNAs – micro RNAs.

7.3.1 Ethics approval

This study was performed in accordance with the ethical standards of the Research Ethics Committee of the Health Sciences Sector (Federal University of Paraná) (CAAE: 55965316.1.0000.0102), according to Resolution 466/2012 of the National Health Council and the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards. Informed consent was obtained from all participants included in the study.

7.3.2 Association study

7.3.2.1 Research participants

The 150 LOAD patients were recruited from the Clinical Hospital of the Federal University of Paraná (HC-UFPR) (n = 97) and the Institute of Neurology of Paraná (INC) (n = 53). To be included, patients should be diagnosed with LOAD based on the clinical history and cognitive tests (FROTA et al., 2011). Forms of dementia other than LOAD, inconclusive diagnosis, and less than 60 years of age were exclusion criteria. The elderly controls (114 individuals) were confirmed to be healthy and neurologically normal, according to their medical history and scores in Mini-Mental State Examination (MMSE) scale. Individuals with infectious diseases or 60-65 years of age and familial history of AD were excluded from both groups. Since *APOE* (*apolipoprotein E*) rs7412 and rs429358 polymorphisms are strongly associated with LOAD (LANE et al., 2018), we previously genotyped the samples by real-time TaqMan PCR (Life Technologies 4351379) to correct for the presence of the LOAD-associated alleles in logistic regression analyses. Further sample descriptions can be found in Table 1.

TABLE 1 DEMOGRAPHIC AND CLINICAL CHARACTERISTICS OF RESEARCH PARTICIPANTS

VARIABLE	CONTROLS n = 114 (%)	PATIENTS n = 150 (%)
Male (%)	28 (24.8)	52 (34.7)
Average age (min-max)	70.8 (60-99)	75.6 (60-90)
<i>APOE</i> $\epsilon 4+$ (%)	20 (17.7)	70 (47.9)
PREDOMINANT ETHNICITY		
Euro-Brazilian (%)	92 (80.7)	120 (80)
Admixed (%)	20 (17.5)	28 (18.7)
Indeterminate (%)	2 (1.8)	2 (1.3)

Ancestry was self-reported. The proportions agree with the South Brazilian population's actual genomic composition (LIMA-COSTA et al., 2015). We emphasize that Euro-Brazilian participants are descendants of Europeans but are admixed. *APOE – Apolipoprotein E*.

7.3.2.2 Polymorphisms selection and genotyping

Total DNA was extracted from peripheral blood using the salting-out standard protocol (LAHIRI; NUMBERGER, 1991). We genotyped eighteen single nucleotide polymorphisms (SNPs), listed in Table 2. SNPs selection was based on their association with LOAD in GWAS conducted with European and North American populations with European ancestry, accessing the GWAS catalog (BUNIELLO et al., 2019). These populations are more similar to the South Brazilian population, whose ancestry has a strong European component, mainly from the Iberian and Tuscany regions (LIMA-COSTA et al., 2015). Selected SNPs should also be located in regulatory regions or act as an expression quantitative trait locus (eQTLs). SNP rs3857059 was the only exception since it was originally associated with a GWAS with Parkinson's disease. We selected it to evaluate if it could be associated with LOAD in our population.

Genotyping was performed by mass spectrometry using the iPLEX MassARRAY Platform (Sequenom, San Diego, CA) at Auckland University (N.Z.).

TABLE 2 SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS (SNPS) SELECTED FOR THIS STUDY AND THEIR MINOR ALLELES FREQUENCIES.

REGION / CLOSEST GENE	SNP	ALLELES (maj./min.)	CHR	POSITION GRCh38.p12	REGION	CONTROL		PATIENTS		GWAS			AD	REFERENCE
						%	N&	%	N&	CEU	TSI	IBS		
<i>ABCA7</i>	rs4147929	G/A	19	1063444	Intron	17.7	226	17.0	300	18	22	23	0	(LAMBERT et al., 2013)
<i>ADAMTS9</i>	rs704454	T/C	3	64941350	Intron	24.7	218	25.3	288	26	30	29	19	(KAMBOH et al., 2012)
<i>APOE</i>	rs769449	G/A	19	44906745	Intron	7.14	224	20.6	296	15	9	8	0	(CRUCHAGA et al., 2013)
<i>BINI- CYP27C1</i>	rs6733839	C/T	2	127135234	Intergenic	33.04	224	40.0	300	40	42	31	39	(LAMBERT et al., 2013)
	rs744373	A/G	2	127137039	Intergenic	28.3	222	34.8	290	30	29	25	56	(HOLLINGWORTH; HAROLD; SIMS; et al., 2011)
<i>C2AP</i>	rs10948363	A/G	6	47520026	Intron	25.6	226	26.3	300	28	24	24	10	(LAMBERT et al., 2013)
<i>CD33</i>	rs3865444	C/A	19	51224706	Promoter	32.6	224	33.4	296	32	27	29	1	(HAROLD et al., 2009; LAMBERT et al., 2009)
<i>CELF1</i>	rs10838725	T/C	11	47536319	Intron	30.7	228	28.7	300	34	34	29	0	(LAMBERT et al., 2013)
<i>CLU</i>	rs11136000	C/T	8	27607002	Intron	41.6	226	40.7	300	37	40	36	60	(HAROLD et al., 2009; LAMBERT et al., 2009)
<i>CTNNA2</i>	rs2974151	C/G	2	79926171	Intron	14.6	226	12.2	296	12	15	11	15	(CUMMINGS et al., 2012)
<i>EPHA1</i>	rs11771145	G/A	7	143413669	Intron	36.7	226	32.7	300	35	36	35	59	(LAMBERT et al., 2013)
<i>INPP5D</i>	rs35349669	C/T	2	233159830	Intron	38.5	226	36.3	300	42	43	40	5	(HOLLINGWORTH; HAROLD; SIMS; et al., 2011)
<i>MS4A6A</i>	rs610932	G/T	11	60171834	Intergenic	41.5	224	41.2	296	52	53	43	42	(HOLLINGWORTH; HAROLD; SIMS; et al., 2011)
<i>PICALM</i>	rs3851179	C/T	11	86157598	Intergenic	33.6	226	33.4	296	43	36	35	5	(HAROLD et al., 2009)
<i>ZCWPW1</i>	rs1476679	T/C	7	100406823	Intron	20.8	226	23.0	300	32	31	21	0	(LAMBERT et al., 2013)
<i>PTK2B</i>	rs28834970	T/C	8	27337604	Intron	35.0	226	35.3	300	34	33	35	18	(LAMBERT et al., 2013)
<i>SLC24A4</i>	rs10498633	G/T	14	92460608	Intron	17.3	226	18.0	300	18	16	22	11	(SIMÓN-SÁNCHEZ et al., 2009; LINNERTZ et al., 2014)
<i>SNCA</i> ⁴	rs3857059	A/G	4	89754087	Intron	19.9	226	17.1	292	8	7	7	65	(SIMÓN-SÁNCHEZ et al., 2009; LINNERTZ et al., 2014)

A- Although this SNP does not appear associated with AD in GWAS, it is commonly associated with Parkinson's disease (P.D.) GWAS. We selected this SNP to see if we would find any association with LOAD in our population. Allele frequencies of the investigated SNPs: Three European populations and one African population are presented for comparative purposes. SNPs - single nucleotide polymorphism; ? - No information or both alleles were AD-

associated in independent studies; maj. – major allele; min. – allele; CEU - population of Utah with northern and western European ancestry; TSI - population of Toscana, Italy; IBS – Iberian population, Spain; YRI - African population of Yoruba. *Allele frequencies according to data from the 1000 Genomes project (CONSORTIUM, 2010); ABCA7 - ATP binding cassette subfamily A member 7; ADAMTS9-AS2 - ADAMTS9 antisense RNA 2; APOE-Apolipoprotein E; BIN1- Bridging integrator 1; CYP27C1 - Cytochrome P450 family 27 subfamily C member 1; CD2AP - CD2 associated protein; CD33 - CD33 molecule; CELF1 - CUGBP Elav-like family member 1; CLU – Clusterin; CTNNA2 - Catenin alpha 2; EPHA1 - EPH receptor A1; INPP5D - Inositol polyphosphate-5-phosphatase D; MS4A6A - Membrane spanning 4-domains A6A; PICALM - Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein; ZCWPW1 - Zinc finger CW-type and PWWP domain containing 1; PTK2B - Protein tyrosine kinase 2 beta; SLC24A4 - Solute carrier family 24 member 4; SNCA - Synuclein alpha; & = number of chromosomes. Some samples were excluded due to low genotyping quality. The maximum sample number was 150 patients (300 chromosomes) and 114 elderly controls (228 chromosomes).

7.3.2.3 Association analysis

Allelic and genotypic frequencies were obtained by direct counting and their distribution evaluated according to the Hardy-Weinberg equilibrium hypothesis (applied by PLINK v.1). Differences between the distributions of polymorphisms in patients and controls were compared using exact Fisher test and binary multivariate logistic regression (dominant, recessive, and additive models) with STATA v.9.2 (Statacorps, Lakeway Drive, TX), correcting for independent variables (Table 3). Only independent variables with p-values lower than 0.22 were considered for multivariate regression analysis. Only models with intercept values corresponding to $p \leq 0.05$ were considered. The p-values were corrected for multiple testing using the false discovery rate (FDR) method (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995), performed in R language 3.6.1, through the Stats package (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011). Corrected p-values (P_c) lower than 0.05 were considered significant.

TABLE 3. RESULTS OF UNIVARIATE ANALYSIS FOR ALL AVAILABLE VARIABLES

INDEPENDENT VARIABLE	O.R.	[95%] C.I.	P-VALUE
Ethnicity	0.93	0.49-1.76	0.827
Sex	0.62	0.36-1.07	0.086
Schooling	0.88	0.73-1.07	0.215
Smoking habit	2.28	1.27-4.09	0.006
Alcoholism	3.24	1.45-7.22	0.004
Diabetes	0.81	0.45-1.45	0.476
Cholesterol	0.75	0.44-1.29	0.299
Hypertension	0.71	0.40-1.25	0.232
BMC	0.65	0.45-0.96	0.029
AD in family	4.87	2.25-10.53	<0.000
<i>e2</i>	1.85	0.73-4.66	0.192
<i>e3</i>	0.13	0.03-0.57	0.007
<i>e4</i>	4.28	2.39-7.66	<0.000

Variables with P values lower than 0.220 were considered for multivariate regression analysis (in bold).

7.3.3 In silico analysis

To further explore the genetic associations found in the South Brazilian population, we performed in silico analysis using publicly available tools and databases (cited in Supplementary Table 1).

7.3.3.1 Linkage disequilibrium (LD)

Since many of the variants found associated in GWAS are not responsible for the disease and probably act as tagSNPs, we performed the LD analysis for the variants that remained associated after correction for independent variables and FDR. We used the LDlink proxy tool, considered as LD variants only those with $r^2 > 0.8$ in at least one of the populations: Utah with northern and western European ancestry (CEU), Toscana (TSI), and Iberian (IBS).

7.3.3.2 Search for associations in the literature

For all variants considered in LD and the SNPs associated in this study, we searched for previous associations in the literature with AD through PubMed, Web of Science, and Google Scholar databases. As search terms, we initially used only each variant to check all the associations already reported. Later, we filtered for articles that included the word "Alzheimer" in the title or abstract.

7.3.3.3 Expression and splicing quantitative trait locus (eQTLs/sQTLs)

For SNPs associated in this study and all variants in LD with them, we evaluated their possible role as eQTL or sQTL in brain tissue and/or whole blood (GTEx and Braineac). All genes whose expression level was associated with these eQTLs and sQTLs, as well the genes where the variants in LD were located, were investigated for their characteristics, expression, regulation, structure, function of the encoded protein, as well as their proteins network, and possible associations with diseases reported in the literature.

7.3.3.4 Investigation of noncoding RNAs (ncRNAs) possibly related to AD through the associated or LD variants

For all the SNPs associated in this study and their respective variants in LD, we evaluated the physical location, especially if they occur within the sequence of noncoding RNAs (ncRNA) genes, where they may affect the structure and function of the ncRNA. For variants in long noncoding RNAs (lncRNA), we analyzed whether they could lead to a change of their secondary structure or a gain/loss of microRNA (miRNA)

binding sites, disturbing lncRNA-miRNA interactions (since both can be endogenous competitors). We also searched for information on expression, function, and previous associations of these lncRNAs in the literature and corresponding databases. All lncRNAs were mapped according to their genomic coordinates using UCSC (GRch38.p13). We also looked for genes within 2kb distance from the 5' and 3' sequence limits of these lncRNAs genes.

7.3.3.5 Secondary structure of lncRNA prediction

All variants found in the sequence of lncRNA genes occurred within exons, possibly resulting in a structural and, consequently, functional change. The secondary structure of the lncRNAs was predicted through the online version of the RNAfold WebServer, based on the Vienna RNA package. We obtained the lncRNA sequences through NONCODE and searched for the variant's location within the lncRNA using the Ensembl and UCSC databases (GRch38.p13). For each lncRNA, we generated secondary structures for both alleles of the variant, using the calculation of minimum free energy (MFE) and positional entropy. To assess the mutation's possible impact on the structure, we considered the conformational change of the molecule and the p-value provided by the lncRNASNP2 database. This p-value is empirical, generated by the SNP's position, the GC content of the molecule, and the size of the sequence ($p < 0.2$ indicating =possibly harmful).

7.3.3.6 Investigation of miRNAs that are possibly affected by the presence of variants in lncRNAs

For the miRNAs affected by the variants identified in the lncRNA gene sequences, we investigated the tissue expression, lncRNA-miRNA interaction, pathway enrichment, and genes regulated by them, as well as previous associations in the literature. For the analysis of pathways, we considered only those related to Alzheimer's disease's pathophysiology through miRPath (KEGG and G.O. pathway).

7.4 RESULTS

7.4.1 Association study

Genotypic distributions were in Hardy-Weinberg equilibrium for both patients and controls (Tables 2, 4, and Supplementary Table 2).

Using binary logistic regression, we selected nine independent variables with a tendency or an association with LOAD (p-value < 0.220). We used them in the multiple regression models to correct any associations with polymorphisms (Tables 3 and 4, and Supplementary Table 2). Of the 18 selected SNPs, only four remained associated after correction for independent variables and FDR: rs769449 (*APOE*); rs6733839 and rs744373 (*BIN1-CYP27C1*); and rs10838725 (*CELF1*) (Table 4).

TABLE 4. SIGNIFICANT RESULTS OF THE POLYMORPHISMS INVESTIGATED WITH LOAD

REGION	SNP		O.R.	C.I. [95%]	P	Pc [#]	I.V.	HWE	
								CON.	PAT.
<i>APOE</i>	rs769449	<i>A/A</i> *	-	-	-				
		<i>A/G</i>	0.84	0.32-2.25	0.736				
		<i>G/G</i>	0.28	0.14-0.57	<0.000	0.0002	BMC	1	1
		<i>A+</i>	3.55	1.76-7.19	<0.000	0.0002	BMC		
		<i>G+*</i>	-	-	-				
		additive model	3.49	1.80-6.76	<0.000	0.0002	BMC		
<i>BIN1-CYP27C1</i>	rs6733839	<u><i>C/C</i></u>	0.55	0.29-1.05	<u>0.070</u>		BMC, e4		
		<i>C/T</i>	1.30	0.70-2.41	0.406				
		<i>T/T</i>	1.96	0.76-5.05	0.165			0.281	0.865
		<i>C+</i>	0.51	0.20-1.32	0.165				
		<u><i>T+</i></u>	1.81	0.95-3.43	<u>0.070</u>		BMC, e4		
		additive model	1.62	1.01-2.59	0.045	0.049	BMC, e4		
	rs744373	<i>A/A</i>	0.69	0.36-1.29	0.246				
		<i>A/G</i>	0.98	0.51-1.86	0.948				
		<i>G/G</i>	2.83	1.04-7.66	0.041	0.049	e4	0.242	0.856
		<u><i>A+</i></u>	0.32	0.10-1.0	<u>0.051</u>		BMC, e4		
	<i>G+</i>	1.45	0.77-2.74	0.246					
	<u>additive model</u>	1.55	0.96-2.51	<u>0.076</u>		BMC, e4			
<i>CELF1</i>	rs10838725	<i>C/C</i>	0.21	0.04-0.99	0.049	0.049	BMC, e4		
		<i>C/T</i>	1.48	0.80-2.75	0.212				
		<i>T/T</i>	0.95	0.52-1.75	0.875			0.660	0.110
		<i>C+</i>	1.05	0.57-1.93	0.875				
		<i>T+</i>	4.88	1.01-23.60	0.049	0.049	BMC, e4		
		additive model	0.83	0.50-1.36	0.453				

The values are result of logistic regression performed by STATA. In bold: significant P-value; in underline: trend; OR - *odds ratio*; CI - confidence interval; P= P-value; Pc# - P-value correct for false discovery rate; I.V. – independent variable; HWE – Hardy-Weinberg equilibrium; PAT – Patients; CON - Controls; BMC - Body mass composition; + - allele carrier; * - It is not possible to calculate since all the controls have the *rs769449*G* allele. *APOE*- *Apolipoprotein E*; *BIN1*- *Bridging integrator 1*; *CYP27C1* - *Cytochrome P450 family 27 subfamily C member 1*; *CELF1* - *CUGBP Elav-like family member 1*. The table with all results is in Supplementary Table 2.

7.4.2 In silico analysis

7.4.2.1 Identification of variants in LD, eQTL/sQTL effect, and interference in ncRNAs

We investigated variants in LD with the four associated SNPs in the CEU, TSI, and IBS populations and found a total do 54 SNPs in LD with them ($r^2 > 0.8$, Supplementary Table 3.).

For *rs10838725* (*CELF1*), we found 49 variants in LD, present in the following genes: *CELF1*, *MTCH2*, *AGBL2*, *FNBP4*, *NUP160*, and in intergenic regions: *NDUFS3* - *FAM180B*, *C1QTNF4* - *MTCH2*, *NUP160* – *PTPRJ* (Supplementary Figure 1). In addition to the *rs10838725* (*CELF1*) itself, of the 49 variants in LD with this SNP, 40 act as eQTL for *NDUFS3*, *FAM180B*, *SLC39A13*, *C1QTNF4*, *MYBPC3*, *PTPRJ*, *FNBP4*, *MADD*, *ARHGAP1*, *ARFGAP2*, *PTPMT1*, and *ACP2*, and sQTLs for *SLC39A13* and *SPI1* in brain regions and/or whole blood. Two variants in LD with *rs10838725* (*rs71457224* and *rs10769282*) occur within a lncRNA (*NONHSAT021264.2*) gene, where probably, *rs10769282* results in the loss of a binding site for hsa-miR-373-5p.

There are three SNPs in LD with *rs769449* (*APOE*), one of which (*rs429358*) is responsible for the *APOE**ε4 isoform. The *rs7256200* and *rs10414043* act as eQTLs for *RSPH6A* in intralobular white matter (Supplementary Figure 2). Besides that, *rs769449* itself, *rs10414043*, and *rs429358* can lead to alternative splicing (sQTL) of the *TOMM40* pre-mRNA in the cerebellar hemisphere and cerebellum. In addition, *rs429358* is also an sQTL for the *APOE* gene in the basal ganglia. The *rs10414043* and *rs7256200* occur within the *NONHSAT179794.1* lncRNA gene. According to *in silico* prediction, the *rs10414043* leads to a gain (hsa-miR-5089-3p) and a loss (hsa-miR-1273g-3p, hsa-miR-4252, and hsa-miR-1227-3p) of miRNA binding sites in this lncRNA, whereas *rs7256200* leads to a loss of the hsa-miR-4284 binding site. Besides , *rs429358* is located within two lncRNA genes (*NONHSAT066732.2* and

NONHSAT179793.1), resulting in a gain (hsa-miR-4479) and a loss (hsa-miR-4479) of miRNA binding sites in *NONHSAT066732.2* and a gain (hsa-miR-6869-3p) in *NONHSAT179793.1*.

The rs6733839 (*BIN1-CYP27C1*) is in LD only with the rs4663105. This SNP acts as an eQTL for the *BIN1* gene in the cerebellum and whole blood. Also, this SNP occurs within a lncRNA gene (*NONHSAT187478.1*), resulting in gain (hsa-miR-6776-5p and hsa-miR-4455) and loss (hsa-miR-6839-3p) of miRNA sites. Another SNP investigated in the *BIN1-CYP27C1* region (rs744373) is in LD only with rs730482. None of them act like an eQTL/sQTL, but both occur within the *NONHSAT182593.1* lncRNA gene, where rs744373 can lead to a gain (hsa-miR-5008-5p) or loss (hsa-miR-2467-5p, hsa-miR-657, hsa-miR-6822-3p) of miRNA binding sites, and rs730482 can result in the loss of various miRNA binding sites (hsa-miR-192-5p, hsa-miR-215-5p, hsa-miR-4766-3p, hsa-miR-1224-3p).

7.4.2.2 Characterization and secondary structure of candidate lncRNAs

We found six lncRNAs potentially involved in LOAD, carrying eight investigated variants, of which only rs744373 was associated in the South Brazilian population (Table 5). There is a general lack of information about these lncRNAs, mostly derived from databases. Except for *NONHSAT066732.2*, for which it is unknown whether it is not expressed in this tissue or has just not been analyzed, all others are expressed in the brain.

All the variants occur within the mature lncRNA sequence. According to results from the lncRNASNP2 database, which provides an empirical p-value for structural lncRNA damage ($p < 0.2$ = possibly harmful), we predicted a possible harmful shift in the secondary structure of *NONHSAT179794.1* (due to rs7256200 - $p = 0.2019$), *NONHSAT066732.2* and *NONHSAT179793.1* (due to rs429358 – $p = 0.0666$ for both). Besides, a structural variation is clearly noticeable for *NONHSAT021264.2* (rs71457224 and rs10769282) and *NONHSAT182593.1* (rs744373 and rs730482), but possibly are not harmful (Figure 2).

Through ncRPheno, a comprehensive database that provides experimentally supported associations between noncoding RNAs and disease phenotypes, we found that *NONHSAT179794.1*, *NONHSAT179793.1*, *NONHSAT187478.1*,

NONHSAT182593.1 could lead to neurodegenerative disorders (including LOAD) (Supplementary Figure 3).

7.4.2.3 miRNA binding sites affected by SNPs in lncRNAs

The presence of SNPs in lncRNAs could create or disrupt a miRNA binding site. We identified 20 miRNAs whose binding sites were affected by SNPs located within lncRNAs, of which seven gained and thirteen lost a binding site (Table 5).

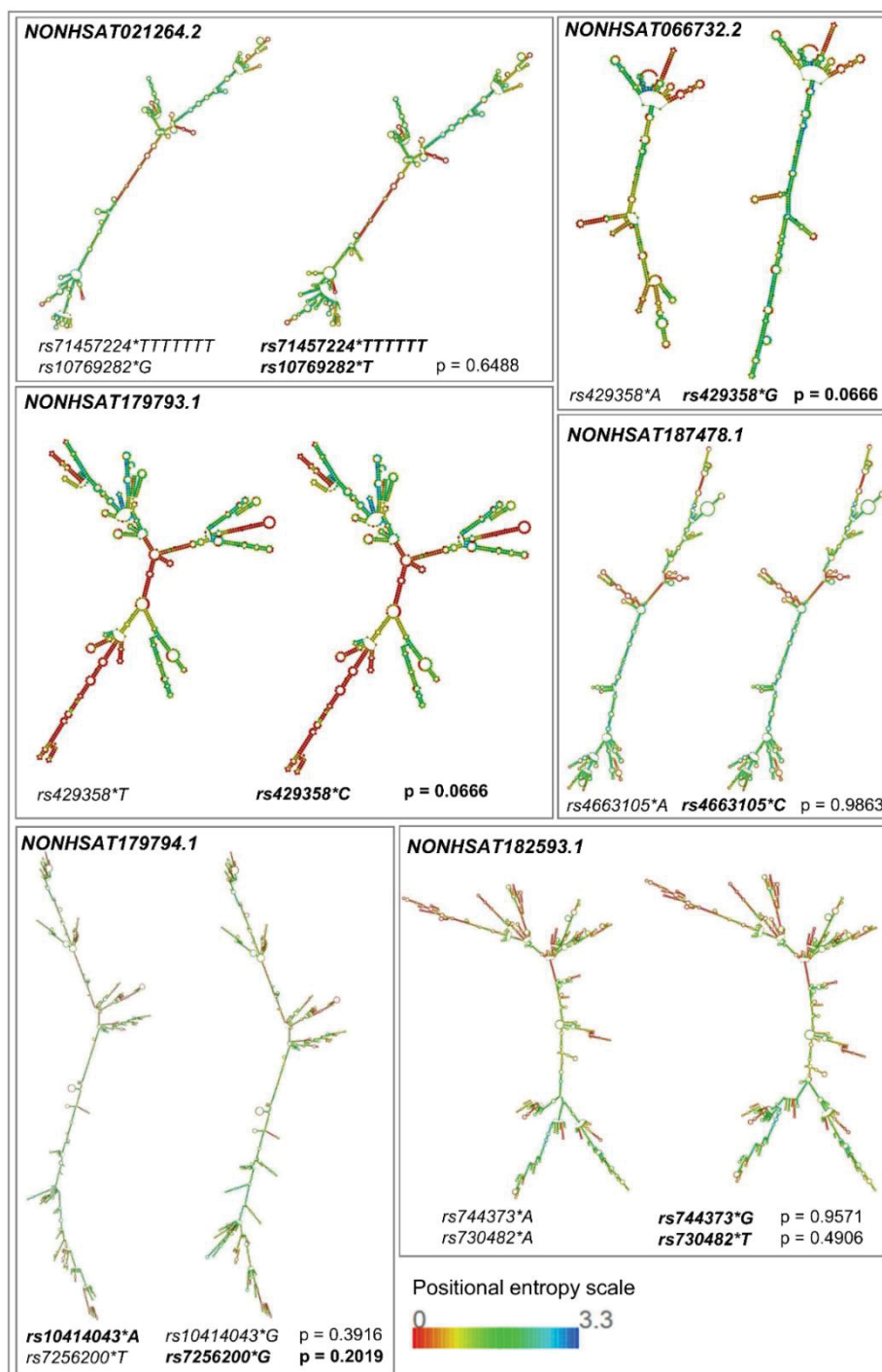
Of the 20 miRNAs, 14 are known to be expressed in the brain. All others do not have enough data to determine whether they are expressed or not in the brain. Only four were previously associated with any neurological disease or with AD risk factors: hsa-miR-373-5p with schizophrenia (PALA; DENKÇEKEN, 2020); hsa-miR-657 with type 2 diabetes (LV et al., 2008); hsa-miR-192-5p with venous thrombosis and type 2 diabetes (LU et al., 2020; RODRIGUEZ-RIUS et al., 2020); has-miR-147b with negative regulation of the inflammatory response (SCHEPPINGEN, VAN et al., 2018).

TABLE 5. CHARACTERIZATION OF LNCRNAs POTENTIALLY INVOLVED IN AD

lncRNA ID	OTHER IDS	POSITION (GRCh38)	GENES WITHIN 2KB	CLASS.	BP	VARIANT	miRNA TARGET GAIN	miRNA TARGET LOSS	P*
NONHSAT021264.2	<i>lnc-FAM180B-2:1</i>	chr11:47602805-47611134	-	lincRNA	1280	rs71457224 rs10769282	-	hsa-miR-373-5p	-
NONHSAT179794.1	<i>AC011481.3</i>	chr19:44909374-44914968	<i>APOE</i> ; <i>APOC1</i>	?	5594	rs10414043	hsa-miR-5089-3p	hsa-miR-1273g-3p hsa-miR-4252 hsa-miR-1227-3p	0.3916
NONHSAT066732.2	<i>lnc-ZNF296-6:1</i>	chr19:44907906-44909013	<i>APOE</i> ; <i>AC011481.3</i>	antisense	526	rs429358	hsa-miR-4479	hsa-miR-147b	0.0666
NONHSAT179793.1	-	chr19:44907758-44909389	<i>APOE</i> ; <i>AC011481.3</i> ; <i>lnc-ZNF296-6:1</i>	?	1051	rs429358	hsa-miR-6869-3p	-	0.0666
NONHSAT187478.1	<i>HSALNT0039381</i>	chr2:127133598-127135107	-	lincRNA	1509	rs4663105	hsa-miR-6776-5p hsa-miR-4455	hsa-miR-6839-3p	0.9863
NONHSAT182593.1	-	chr2:127116083-127139365	<i>lnc-TEX51-4</i>	lincRNA	4459	rs744373 rs730482	hsa-miR-5008-5p	hsa-miR-2467-5p hsa-miR-657 hsa-miR-6822-3p hsa-miR-192-5p hsa-miR-215-5p hsa-miR-4766-3p hsa-miR-1224-3p	0.9571 0.4906

Class. - lncRNA classification; bp – base pairs; * P-value of the possibility of SNP impact the lncRNA structure (this p-value is empirical, being generated in silico, through the position of the SNP, the GC content of the molecule, and the size of the sequence [P <0.2 = possibly harmful]).

FIGURE 2 - PREDICTION OF SECONDARY STRUCTURES OF lncRNAs POSSIBLY INVOLVED IN LOAD.



The secondary structures of the lncRNAs possibly involved in AD were predicted by the RNAfold Web Server based on the Vienna RNA package, considering the calculation of minimum free energy (MFE) and positional entropy. Structures were generated for two alleles of the variant (alleles in bold were deemed a possible harmful role). The impact of these mutations on the structural was established by visually changing the molecule and the P-value provided by lncRNASNP2. This P-value is empirical, being generated in silico, finding the SNP's position, the GC content of the molecule, and the size of the sequence ($P < 0.2$ = possibly harmful). Within the positional entropy scale, low entropy (red) leads to little structural flexibility, making the prediction more reliable, while regions of high entropy (violet) may have several alternative structures.

7.5 DISCUSSION

GWAS are extremely relevant for identifying genome regions associated with the studied disease. However, most of the associated loci have been found in noncoding areas, hindering its relationship in causality with the disease (ALBERT; KRUGLYAK, 2015). Often, the associations reflect the deregulation of gene expression, resulting from changes caused by the presence of variants in regulatory regions (promoters, enhancers) or ncRNAs genes, or even from LD with variants that act as eQTLs / sQTLs (ALBERT; KRUGLYAK, 2015; HU et al., 2019). Also, the associations found are closely related to the genetic background of the assessed population. Most of the GWAS carried out with LOAD used samples from European populations or with European ancestry (GWAS Catalog), which do not necessarily reflect the genetic diversity of other populations. Thus, we sought to replicate in the South Brazilian sample, some of the main associations reported in LOAD-GWAS performed with European-derived populations, investigating the possible functional role of these variants in LOAD development.

The *APOE* (*Apolipoprotein E*) gene may present three distinct allelic variants ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$, and $\epsilon 4$). Its product is probably involved in A β production and/or clearance, neuroinflammation, synaptic loss, and tau hyperphosphorylation, important for the development and progression of LOAD (YU et al., 2014; YAMAZAKI et al., 2019). The *rs429358**C allele corresponds to the $\epsilon 4$ isoform and is considered the most critical genetic susceptibility factor for LOAD development (CORDER et al., 2008; CASTELLANO et al., 2011; LAMBERT et al., 2013). This SNP allele is in LD with *rs769449**A, associated in our sample with susceptibility to LOAD. The *rs429358* is located within two lncRNAs genes (*NONHSAT179793.1* and *NONHSAT066732.2*), leading to a change in the secondary structure of *NONHSAT066732.2*, resulting in the loss of the hsa-miR-147b and the gain for the hsa-miR-4479 binding sites. Increased expression of hsa-miR-147b is associated with down-regulation of the inflammation driven by activated astrocytes (SCHEPPINGEN, VAN et al., 2018). Due to the loss of miRNA-lncRNA interaction caused by *rs429358**G, there is possibly a greater availability of hsa-miR-147b, reducing the inflammatory response. While this may seem beneficial, it possibly harms the clearance of A β plaques promoted by inflammatory elements. Also, through pathway enrichment analysis, we observed that hsa-miR-4479 is involved in the GABAergic pathway regulating the expression of

CACNA1A, *SLC32A1*, *PRKX*, and *SLC12A5* genes (miRPath). With the addition of a binding site in the *NONHSAT066732.2*, this miRNA may be sequestered, leading to an imbalance in GABAergic signaling, which has been considered involved in LOAD pathology (LI et al., 2016). Besides, rs429358 is located in a CpG island and may impact DNA methylation. Foraker and colleagues (2015) demonstrated a difference in this region's methylation profile between individuals with AD and controls. Rs769449 is also in LD with two other variants (rs10414043 and rs7256200) located in the lncRNA *NONHSAT179794.1*, with rs7256200 leading to a structural change in the lncRNA molecule. Recent studies have shown that lncRNAs can affect gene expression found in the proximity (within 2 Kb) (ENGREITZ et al., 2016). Thus, both *NONHSAT179793.1* and *NONHSAT066732.2* may interfere with *APOE* regulation. However, the association observed in our study for rs769449 is possibly related to its LD with other variants having high regulatory potential. Other studies have already shown that the change of the G for an A allele, creating the *rs769449*A* allele, may favor an open chromatin state for the *APOE* gene, along with a correspondent strong H3K4Me3 signal (trimethylation of lysine 4 in histone H3) (RYU et al., 2016; BABENKO et al., 2018). Furthermore, the *rs769449*A* allele is absent in older people with greater longevity, being related to poor LOAD prognoses, such as inferior recovery of late verbal memory and faster cognitive decline (SOERENSEN et al., 2013; ZHANG; PIERCE, 2014; ARPAWONG et al., 2017).

Variants of *BIN1* (*bridging integrator 1*) commonly show the second-highest odds-ratios for LOAD, lagging only behind *APOE* variants (TAN, M.-S. et al., 2013; CROTTI et al., 2019; FRANZMEIER et al., 2019). It is involved in endocytosis, sustained cytoskeleton integrity, regulation of tau peptide, and probably inflammation, calcium homeostasis, and apoptosis (TAN, M.-S. et al., 2013; SARTORI et al., 2019; THOMAS et al., 2019; CROTTI et al., 2019; FRANZMEIER et al., 2019). Tau is a microtubule-associated protein, which under a pathological condition, is phosphorylated (pTau) and assembles into insoluble aggregates (neurofibrillary tangles), leading to synaptic dysfunction and neural cell death, which plays an essential role in the development and progression of LOAD (THOMAS et al., 2019; FRANZMEIER et al., 2019). Our study validated the association of the two rs6733839 and rs744373 SNPs, located in the *BIN1-CYP27C1* region. Rs6733839 carriage is associated with higher pTau181 levels in CSF (CROTTI et al., 2019). Homozygote individuals for *rs6733839*T* show worse episodic memory (GREENBAUM et al., 2016).

This SNP is in LD with rs4663105, which occurs in the *NONHSAT187478.1* lncRNA gene, possibly associated with neurodegenerative diseases (ncRPheno). Also, rs4663105 is an eQTL for *BIN1* in the cerebellum and whole blood (GTEx). The rs744373 was recently associated with increased tau pathology in LOAD (FRANZMEIER et al., 2019). We found this SNP and rs730482 (both in LD) in *NONHSAT182593.1* lncRNA, possibly associated with neurodegenerative diseases (ncRPheno).

CELF1 (*CUGBP Elav-like family member 1*) gene encodes CELF-1 protein, an RNA-binding protein related to the regulation of different post-transcriptional events and alternative splicing, mRNA translation, and mRNA stability (BEISANG et al., 2012; BATEMAN et al., 2017). During alternative RNA processing, the protein can select the splicing target site by binding to U / G rich elements in the transcript sequence, leading to mRNA decay and controlling translation efficiency (preprint David et al., 2020). The rs10838725 polymorphism has been associated with LOAD in GWAS (LAMBERT et al., 2013; KARCH et al., 2016; MARIONI et al., 2018). However, this SNP possibly is not the only causal SNP, since it occurs in LD with several variants distributed in distinct genes, intergenic regions, and *NONHSAT021264.2* lncRNA region (rs71457224 and rs10769282). Besides that, in this LD block, several variants act as eQTLs/sQTLs in the brain and whole blood, altering the expression of many genes already related to LOAD or other neurological diseases in humans or animal studies, like the *CELF1* itself, *MADD*, *MYBPC3*, *NR1H3*, *NUP160*, *SPI1*, and *TOMM40* (NATUNEN et al., 2013; KARCH et al., 2016; DOURLLEN et al., 2017; HUANG et al., 2017; KATSUMATA et al., 2019; ZHU et al., 2019, 2020; LUTZ et al., 2020).

Our work has some limitations: it does not share the statistical power of GWAS studies for validation of allelic associations, and we might have missed some true associations with alleles of lower frequency due to the smaller sample size. Furthermore, the secondary structures of lncRNA are the result of an *in silico* analysis. This structural prediction does not consider the huge complexity of possible interactions within a RNA molecule and its interactions with other molecules, which can dramatically alter its structure. The *in silico* analysis results from the compilation of information obtained in online databases, some of which lack experimental validation.

Nonetheless, we replicated in the South Brazilian population the associations already reported with LOAD in European GWAS for *APOE*, *BIN1* and *CELF1*. Of the eighteen polymorphisms analyzed, only four remained associated with South Brazilian

population (these are the first confirmatory results for these polymorphisms in the Brazilian population), corroborating previous studies of our group (KRETZSCHMAR et al., 2020). This highlights the importance of replication of associated variants in different ethnicities, to contribute for a more personalized and inclusive medicine.

Furthermore, the need for functional exploration of the genetic associations found in large-scale studies is explicit, since most are not causal. Many of the associated variants are in LD with causal polymorphisms. They may act as eQTLs / sQTLs for other genes (as observed for *CELF1* rs10838725), located in regions of regulation of gene expression or ncRNAs genes. The influence of lncRNAs in the regulation of genes, which can cause pathological disorders, is becoming increasingly evident (SALVIANO-SILVA et al., 2018; CIPOLLA et al., 2018). Through the LD analysis performed for the four associated SNPs in our study, we were able to find six lncRNAs that are possibly playing a role in LOAD and which had not been analyzed until now. Some polymorphisms can lead to changes in the secondary structure of these lncRNAs, resulting in loss or gain in the binding of miRNAs, probably deregulating essential pathways and consequently, causing the disease. Experimental validation studies of these lncRNAs and their alleles in LOAD can contribute to a better understanding of the disease. Thus, our study brings new promise targets for future research in Alzheimer disease.

7.6 ACKNOWLEDGMENTS

We are deeply grateful for all the research participants, especially for patients. We thank the Polymorphism and Linkage Laboratory / UFPR staff for their assistance in DNA extraction.

CONFLICT OF INTEREST: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS: ABWB administered the project and supervised this work. GCK and CGM contributed to the conception of the work, curated, and analyzed the data. SSLS, CDS obtained and prepared the samples. GCK, NMA, SSLS, CDS

performed the investigation. RLRS provided the samples, and MLPE and ABWB provided resources and funding for analysis. GCK drafted and edited the manuscript, after critical review for intellectual content, by all co-authors. All approved the final version of the work.

FUNDING: This work was supported by grants of Fundação Araucária (F.A. protocol 39894.413.43926.1904/2013 and 116/2018, protocol 50.530) and by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) (40001016006P1) and CAPES/PROAP Finance Code 001. ABWB receives a research productivity scholarship from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 314288/2018-0). The funding agencies had no role in study design, in the collection, analysis, and interpretation of data, in the writing of the letter, and in the decision to submit it for publication.

7.7 REFERENCE

- Albert, F. W., and Kruglyak, L. (2015). The role of regulatory variation in complex traits and disease. *Nat. Rev. Genet.* 16, 197–212. doi:10.1038/nrg3891.
- Arpawong, T. E., Pendleton, N., Mekli, K., McArdle, J. J., Gatz, M., Armoskus, C., et al. (2017). Genetic variants specific to aging-related verbal memory: Insights from GWASs in a population-based cohort. *PLoS One* 12. doi:10.1371/journal.pone.0182448.
- Babenko, V. N., Afonnikov, D. A., Ignatieva, E. V., Klimov, A. V., Gusev, F. E., and Rogaev, E. I. (2018). Haplotype analysis of APOE intragenic SNPs. *BMC Neurosci.* 19, 16. doi:10.1186/s12868-018-0413-4.
- Bateman, A., Martin, M. J., O'Donovan, C., Magrane, M., Alpi, E., Antunes, R., et al. (2017). UniProt: The universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 45, D158–D169. doi:10.1093/nar/gkw1099.
- Beisang, D., R., P., and Vlasova-St. Louis, I. A. (2012). “CELF1, a Multifunctional Regulator of Posttranscriptional Networks,” in *Binding Protein* (InTech). doi:10.5772/48780.
- Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate : A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J.R. Stat. Soc. B* 57, 289–300.
- Braak, H., and Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 82, 239–259. doi:10.1007/BF00308809.
- Buniello, A., MacArthur, J. A. L., Cerezo, M., Harris, L. W., Hayhurst, J., Malangone, C., et al. (2019). The NHGRI-EBI GWAS Catalog of published genome-wide association studies, targeted arrays and summary statistics 2019. *Nucleic Acids Res.* 47, D1005–D1012. doi:10.1093/nar/gky1120.
- Castellano, J. M., Kim, J., Stewart, F. R., Jiang, H., DeMattos, R. B., Patterson, B. W., et al. (2011). Human apoE Isoforms Differentially Regulate Brain Amyloid-Peptide Clearance. *Sci. Transl. Med.* 3, 89ra57-89ra57. doi:10.1126/scitranslmed.3002156.
- Cipolla, G., de Oliveira, J., Salviano-Silva, A., Lobo-Alves, S., Lemos, D., Oliveira, L., et al. (2018). Long Non-Coding RNAs in Multifactorial Diseases: Another Layer of Complexity. *Non-Coding RNA* 4, 13. doi:10.3390/ncrna4020013.
- Consortium, T. 1000 G. P. (2010). A map of human genome variation from

- population-scale sequencing. *Nature* 467, 1061–73. doi:10.1038/nature09534.
- Corder, E. H., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Small, G. W., et al. (2008). Gene Dose of Apolipoprotein E Type 4 Allele and the Risk of Alzheimer's Disease in Late Onset Families Published by : American Association for the Advancement of Science Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/2882127>. *Adv. Sci.* 261, 921–923.
- Crotti, A., Sait, H. R., McAvoy, K. M., Estrada, K., Ergun, A., Szak, S., et al. (2019). BIN1 favors the spreading of Tau via extracellular vesicles. *Sci. Rep.* 9, 9477. doi:10.1038/s41598-019-45676-0.
- Cruchaga, C., Kauwe, J. S. K., Harari, O., Jin, S. C., Cai, Y., Karch, C. M., et al. (2013). GWAS of Cerebrospinal Fluid Tau Levels Identifies Risk Variants for Alzheimer's Disease. *Neuron* 78, 256–268. doi:10.1016/j.neuron.2013.02.026.
- Cummings, A. C., Jiang, L., Velez Edwards, D. R., Mccauley, J. L., Laux, R., Mcfarland, L. L., et al. (2012). Genome-Wide Association and Linkage Study in the Amish Detects a Novel Candidate Late-Onset Alzheimer Disease Gene. *Ann. Hum. Genet.* 76, 342–351. doi:10.1111/j.1469-1809.2012.00721.x.
- David, G., Rebutier, D., Deschamps, S., Méreau, A., Taylor, W., Padilla-Parra, S., et al. (2020). The RNA-binding proteins CELF1 and ELAVL1 cooperatively control RNA isoform production. *bioRxiv*. doi:https://doi.org/10.1101/373704.
- Dourlen, P., Fernandez-Gomez, F. J., Dupont, C., Grenier-Boley, B., Bellenguez, C., Obriot, H., et al. (2017). Functional screening of Alzheimer risk loci identifies PTK2B as an in vivo modulator and early marker of Tau pathology. *Mol. Psychiatry* 22, 874–883. doi:10.1038/mp.2016.59.
- Engreitz, J. M., Haines, J. E., Perez, E. M., Munson, G., Chen, J., Kane, M., et al. (2016). Local regulation of gene expression by lncRNA promoters, transcription and splicing. *Nature* 539, 452–455. doi:10.1038/nature20149.
- Foraker, J., Millard, S. P., Leong, L., Thomson, Z., Chen, S., Keene, C. D., et al. (2015). The APOE Gene is Differentially Methylated in Alzheimer's Disease. *J. Alzheimer's Dis.* 48, 745–755. doi:10.3233/JAD-143060.
- Franzmeier, N., Rubinski, A., Neitzel, J., and Ewers, M. (2019). The BIN1 rs744373 SNP is associated with increased tau-PET levels and impaired memory. *Nat. Commun.* 10, 1766. doi:10.1038/s41467-019-09564-5.
- Frota, N. A. F., Nitrini, R., Damasceno, B. P., Forlenza, O., Dias-Tosta, E., Silva, A. B. da, et al. (2011). Critérios para diagnóstico de doença de Alzheimer. *Dement.*

- Neuropsychol.* 5, 5–10. Available at:
<http://www.fundaciondiabetes.org/infantil/178/criterios-de-diagnostico-ninos>.
- Greenbaum, L., Ravona-Springer, R., Lubitz, I., Schmeidler, J., Cooper, I., Sano, M., et al. (2016). Potential contribution of the Alzheimer's disease risk locus BIN1 to episodic memory performance in cognitively normal Type 2 diabetes elderly. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 26, 787–795. doi:10.1016/j.euroneuro.2015.11.004.
- Harold, D., Abraham, R., Hollingworth, P., Sims, R., Gerrish, A., Hamshere, M. L., et al. (2009). Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* 41, 1088–93. doi:10.1038/ng.440.
- Hollingworth, P., Harold, D., Sims, R., Gerrish, A., Lambert, C., Carrasquillo, M. M., et al. (2011). Common variants in ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* 43, 429–435. doi:10.1038/ng.803.Common.
- Hu, Y., Zhao, T., Zang, T., Zhang, Y., and Cheng, L. (2019). Identification of alzheimer's disease-related genes based on data integration method. *Front. Genet.* 10, 1–7. doi:10.3389/fgene.2018.00703.
- Huang, K. L., Marcora, E., Pimenova, A. A., Di Narzo, A. F., Kapoor, M., Jin, S. C., et al. (2017). A common haplotype lowers PU.1 expression in myeloid cells and delays onset of Alzheimer's disease. *Nat. Neurosci.* 20, 1052–1061. doi:10.1038/nn.4587.
- Kamboh, M. I., Barmada, M. M., Demirci, F. Y., Minster, R. L., Carrasquillo, M. M., Pankratz, V. S., et al. (2012). Genome-wide association analysis of age-at-onset in Alzheimer's disease. *Mol. Psychiatry* 17, 1340–6. doi:10.1038/mp.2011.135.
- Karch, C. M., Ezerskiy, L. A., Bertelsen, S., and Goate, A. M. (2016). Alzheimer's Disease Risk Polymorphisms Regulate Gene Expression in the ZCWPW1 and the CELF1 Loci. *PLoS One* 11, e0148717. doi:10.1371/journal.pone.0148717.
- Katsumata, Y., Nelson, P. T., Estus, S., and Fardo, D. W. (2019). Translating Alzheimer's disease-associated polymorphisms into functional candidates: a survey of IGAP genes and SNPs. *Neurobiol. Aging* 74, 135–146. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2018.10.017.
- Kretschmar, G. C., Antoniazzi, A. A. H., Oliveira, L. C., Nisihara, R. M., Petzl-Erler, M. L., de Souza, R. L. R., et al. (2020). First Report of CR1 Polymorphisms and Soluble CR1 Levels Associated with Late Onset Alzheimer's Disease (LOAD) in

- Latin America. *J. Mol. Neurosci.* doi:10.1007/s12031-020-01547-2.
- Lahiri, D. K., and Numberger, J. I. (1991). A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.* 19, 5444. doi:10.1093/nar/19.19.5444.
- Lambert, J.-C., and Al, E. (2013). Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* 45, 1452–1458. doi:10.1038/ng.2802.Meta-analysis.
- Lambert, J.-C., Heath, S., Even, G., Campion, D., Sleegers, K., Hiltunen, M., et al. (2009). Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* 41, 1094–1099. doi:10.1038/ng.439.
- Lambert, J.-C., Ibrahim-Verbaas, C. A., Harold, D., Naj, A. C., Sims, R., Bellenguez, C., et al. (2013a). Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* 45, 1452–1458. doi:10.1038/ng.2802.
- Lambert, J.-C., Sorbi, S., Matthews, F., Moebus, S., Beekly, D., Owen, M. J., et al. (2013b). Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* 45, 1452–1458. doi:10.1038/ng.2802.
- Lane, C. A., Hardy, J., and Schott, J. M. (2018). Alzheimer's disease. *Eur. J. Neurol.* 25, 59–70. doi:10.1111/ene.13439.
- Li, Y., Sun, H., Chen, Z., Xu, H., Bu, G., and Zheng, H. (2016). Implications of GABAergic Neurotransmission in Alzheimer's Disease. *Front. Aging Neurosci.* 8, 31. doi:10.3389/fnagi.2016.00031.
- Lima-Costa, M. F., Rodrigues, L. C., Barreto, M. L., Gouveia, M., Horta, B. L., Mambrini, J., et al. (2015). Genomic ancestry and ethnoracial self-classification based on 5,871 community-dwelling Brazilians (The Epigen Initiative). *Sci. Rep.* 5, 9812. doi:10.1038/srep09812.
- Linnertz, C., Lutz, M. W., Ervin, J. F., Allen, J., Miller, N. R., Welsh-Bohmer, K. A., et al. (2014). The genetic contributions of SNCA and LRRK2 genes to Lewy Body pathology in Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.* 23, 4814–4821. doi:10.1093/hmg/ddu196.
- Lu, Y., Li, Y., Li, G., and Lu, H. (2020). Identification of potential markers for type 2 diabetes mellitus via bioinformatics analysis. *Mol. Med. Rep.* 22, 1868–1882. doi:10.3892/mmr.2020.11281.

- Lutz, M. W., Sprague, D., Barrera, J., and Chiba-Falek, O. (2020). Shared genetic etiology underlying Alzheimer's disease and major depressive disorder. *Transl. Psychiatry* 10. doi:10.1038/s41398-020-0769-y.
- Lv, K., Guo, Y., Zhang, Y., Wang, K., Jia, Y., and Sun, S. (2008). Allele-specific targeting of hsa-miR-657 to human IGF2R creates a potential mechanism underlying the association of ACAA-insertion/deletion polymorphism with type 2 diabetes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 374, 101–105. doi:10.1016/j.bbrc.2008.06.102.
- Marioni, R. E., Harris, S. E., Zhang, Q., McRae, A. F., Hagenaars, S. P., Hill, W. D., et al. (2018). GWAS on family history of Alzheimer's disease. *Transl. Psychiatry* 8, 99. doi:10.1038/s41398-018-0150-6.
- Matthew T. Maurano, Richard Humbert, Eric Rynes¹, Robert E. Thurman, E., Haugen, Hao Wang, Alex P. Reynolds, Richard Sandstrom, Hongzhu Qu, J., Brody, Anthony Shafer, Fidencio Neri, Kristen Lee, Tanya Kutuyavin, S. S.-, Sun¹, Audra K. Johnson¹, Theresa K. Canfield¹, Erika Giste¹, Morgan Diegel¹, D., Bates¹, R. Scott Hansen⁴, Shane Neph¹, Peter J. Sabo¹, Shelly Heimfeld⁵, A., Raubitschek⁶, Steven Ziegler⁶, Chris Cotsapas^{7, 8}, Nona Sotoodehnia^{3, 9}, I. G., et al. (2012). Systematic Localization of Common Disease-Associated Variation in Regulatory DNA. *Science (80)*. 337, 1190–1195. doi:10.1126/science.1222794.
- Natunen, T., Martiskainen, H., Sarajärvi, T., Helisalml, S., Pursiheimo, J.-P., Viswanathan, J., et al. (2013). Effects of NR1H3 Genetic Variation on the Expression of Liver X Receptor α and the Progression of Alzheimer's Disease. *PLoS One* 8, e80700. doi:10.1371/journal.pone.0080700.
- Nédélec, Y., Sanz, J., Baharian, G., Szpiech, Z. A., Pacis, A., Dumaine, A., et al. (2016). Genetic Ancestry and Natural Selection Drive Population Differences in Immune Responses to Pathogens. *Cell* 167, 657-669.e21. doi:10.1016/j.cell.2016.09.025.
- Pala, E., and Denkçeken, T. (2020). Evaluation of miRNA Expression Profiles in Schizophrenia Using Principal-Component Analysis-Based Unsupervised Feature Extraction Method. *J. Comput. Biol.* 27, 1253–1263. doi:10.1089/cmb.2019.0412.
- R Development Core Team, R. (2011). R: A Language and Environment for Statistical Computing. *R Found. Stat. Comput.* 1, 409. doi:10.1007/978-3-540-

74686-7.

- Rodriguez-Rius, A., Lopez, S., Martinez-Perez, A., Souto, J. C., and Soria, J. M. (2020). Identification of a Plasma MicroRNA Profile Associated with Venous Thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 1392–1399. doi:10.1161/ATVBAHA.120.314092.
- Ryu, S., Atzmon, G., Barzilai, N., Raghavachari, N., and Suh, Y. (2016). Genetic landscape of APOE in human longevity revealed by high-throughput sequencing. *Mech. Ageing Dev.* 155, 7–9. doi:10.1016/j.mad.2016.02.010.
- Salviano-Silva, A., Lobo-Alves, S. C., de Almeida, R. C., Malheiros, D., and Petzl-Erler, M. L. (2018). Besides pathology: Long non-coding RNA in cell and tissue homeostasis. *Non-coding RNA* 4, 1–37. doi:10.3390/ncrna4010003.
- Sartori, M., Mendes, T., Desai, S., Lasorsa, A., Herledan, A., Malmanche, N., et al. (2019). BIN1 recovers tauopathy-induced long-term memory deficits in mice and interacts with Tau through Thr348 phosphorylation. *Acta Neuropathol.* 138, 631–652. doi:10.1007/s00401-019-02017-9.
- Simón-Sánchez, J., Schulte, C., Bras, J. M., Sharma, M., Gibbs, J. R., Berg, D., et al. (2009). Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. *Nat. Genet.* 41, 1308–12. doi:10.1038/ng.487.
- Soerensen, M., Dato, S., Tan, Q., Thinggaard, M., Kleindorp, R., Beekman, M., et al. (2013). Evidence from case-control and longitudinal studies supports associations of genetic variation in APOE, CETP, and IL6 with human longevity. *Age (Omaha)*. 35, 487–500. doi:10.1007/s11357-011-9373-7.
- Tan, M.-S., Yu, J.-T., and Tan, L. (2013). Bridging integrator 1 (BIN1): form, function, and Alzheimer's disease. *Trends Mol. Med.* 19, 594–603. doi:10.1016/j.molmed.2013.06.004.
- Thomas, S., Hoxha, K., Tran, A., and Prendergast, G. C. (2019). Bin1 antibody lowers the expression of phosphorylated Tau in Alzheimer's disease. *J. Cell. Biochem.* 120, 18320–18331. doi:10.1002/jcb.29142.
- van Scheppingen, J., Mills, J. D., Zimmer, T. S., Broekaart, D. W. M., Iori, V., Bongaarts, A., et al. (2018). miR147b: A novel key regulator of interleukin 1 beta-mediated inflammation in human astrocytes. *Glia* 66, 1082–1097. doi:10.1002/glia.23302.
- Yamazaki, Y., Zhao, N., Caulfield, T. R., Liu, C.-C., and Bu, G. (2019). Apolipoprotein E and Alzheimer disease: pathobiology and targeting strategies. *Nat. Rev.*

- Neurol.* 15, 501–518. doi:10.1038/s41582-019-0228-7.
- Yu, J.-T., Tan, L., and Hardy, J. (2014). Apolipoprotein E in Alzheimer's Disease: An Update. *Annu. Rev. Neurosci.* 37, 79–100. doi:10.1146/annurev-neuro-071013-014300.
- Zhang, C., and Pierce, B. L. (2014). Genetic susceptibility to accelerated cognitive decline in the US Health and Retirement Study. *Neurobiol. Aging* 35, 1512.e11-1512.e18. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2013.12.021.
- Zhu, Z., Lin, Y., Li, X., Driver, J. A., and Liang, L. (2019). Shared genetic architecture between metabolic traits and Alzheimer's disease: a large-scale genome-wide cross-trait analysis. *Hum. Genet.* 138, 271–285. doi:10.1007/s00439-019-01988-9.
- Zhu, Z., Yang, Y., Xiao, Z., Zhao, Q., Wu, W., Liang, X., et al. (2020). TOMM40 and APOE variants synergistically increase the risk of Alzheimer's disease in a Chinese population. *Aging Clin. Exp. Res.* doi:10.1007/s40520-020-01661-6.
- Zhu, Z., Zhang, F., Hu, H., Bakshi, A., Robinson, M. R., Powell, J. E., et al. (2016). Integration of summary data from GWAS and eQTL studies predicts complex trait gene targets. *Nat. Genet.* 48, 481–487. doi:10.1038/ng.3538.

7.8 SUPPLEMENTARY MATERIAL

SUPPLEMENTARY TABLE 1 – DATABASES USED FOR IN SILICO ANALYSES

DATABASE	ANALYZES PERFORMED IN THIS STUDY	URL	REFERENCE
GWAS Catalog	Associated Diseases and traits	https://www.ebi.ac.uk/gwas/	(BUNIELLO et al., 2019)
DisGeNet		https://www.disgenet.org/home/	(PIÑERO et al., 2017)
LDlink	Linkage disequilibrium	https://ldlink.nci.nih.gov/?tab=home	(MACHIELA; CHANOCK, 2015)
UCSC Genome Browser	Gene regulation	https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway	(KENT et al., 2002)
GTEX Portal	Gene expression and eQTLs / sQTLs search	https://www.gtexportal.org/home/	(ARDLIE et al., 2015)
Braineac		http://braineac.org/	(RAMASAMY et al., 2014)
Expression Atlas	Gene expression	https://www.ebi.ac.uk/gxa/home	(PAPATHEODOROU et al., 2020)
Ensembl	General information about the gene / ncRNA	http://www.ensembl.org/index.html	(YATES et al., 2019)
GeneCard		https://www.genecards.org/	(FISHLEVICH et al., 2017)
HGNC		https://www.genenames.org/	(BRUFORD et al., 2020)
UniProt	Structure, expression, and function of the protein	https://www.uniprot.org/	(BATEMAN et al., 2017)
Human Protein Atlas		https://www.proteinatlas.org/	(UHLÉN et al., 2015)
STRING	Protein Network	https://string-db.org/	(SZKLARCZYK et al., 2019)
lncRNASNP2	Search for SNPs in lncRNA region and the impact it on lncRNA secondary structure and miRNA interaction	http://bioinfo.life.hust.edu.cn/lncRNASNP#!/	(MIAO et al., 2018)
miRNASNP v3	Characteristics of miRNA	http://bioinfo.life.hust.edu.cn/miRNASNP#!/	(GONG et al., 2015)
NONCODE	Sequence, structure, and expression of ncRNA	http://www.noncode.org/	(FANG et al., 2018)
LNCipedia	General information about the lncRNA and reports in the literature	https://lncipedia.org/	(VOLDERS et al., 2019)
LncBook		https://bigd.big.ac.cn/lncbook/index	(MA, L. et al., 2019)
RNA Central		https://rnacentral.org/	(SWEENEY et al., 2019)
TANRIC	Identification of lncRNA	https://cutt.ly/bd1HBRf	(LI et al., 2015)
Lncident		https://cutt.ly/1d1HMUP	(HAN et al., 2016)
ncRPheno	Search for associations between ncRNAs and diseases	https://cutt.ly/Yd1H4ie	(ZHANG et al., 2020)
LncRNADisease v2.0		http://www.rnanut.net/lncmadisease/	(BAO et al., 2019)

LnCBase v.2	Prediction of lncRNA -miRNA interaction	https://cutt.ly/fd1HLb4	(PARASKEVOPOULOU et al., 2016)
ENCORI		http://starbase.sysu.edu.cn/index.php	(LI et al., 2014)
miRBase	General information about miRNAs	http://www.mirbase.org/index.shtml	(KOZOMARA et al., 2019)
TissueAtlas	miRNA expression in different tissues	https://ccb-web.cs.uni-saarland.de/tissueatlas/	(LUDWIG et al., 2016)
mirPath	Prediction of miRNA action pathways	http://snf-515788.vm.okeanos.grnet.gr/	(VLACHOS et al., 2015)
TarBase v.8	Search for genes regulated by the miRNA found	https://cutt.ly/Ad1HCK7	(KARAGKOUNI et al., 2018)
RNAfold WebServer	Prediction of the lncRNA secondary structure	https://cutt.ly/Ud1HIG9	(LORENZ et al., 2011)

SUPPLEMENTARY TABLE 2 – RESULTS OF LOGISTIC REGRESSION FOR ALL INVESTIGATED SNPs

REGION	SNP		O.R.	C.I. [95%]	P	Pc [#]	I. V.	HWE	
								CON	PAT
<i>ABCA7</i>	rs4147929	<i>A/A</i>	0.91	0.11-7.45	0.932				
		<i>A/G</i>	1.19	0.61-2.29	0.612				
		<i>G/G</i>	0.86	0.45-1.63	0.637				
		<i>A+</i>	1.17	0.61-2.23	0.637			0.741	0.571
		<i>G+</i>	1.09	0.13-8.94	0.932				
		additive model	1.13	0.63-2.02	0.687				
<i>ADAMTS9-AS2</i>	rs704454	<i>C/C</i>	3.21	0.67-15.34	0.144				
		<i>C/T</i>	0.85	0.44-1.63	0.629				
		<i>T/T</i>	0.98	0.51-1.86	0.953				
		<i>C+</i>	1.02	0.54-1.94	0.953			0.297	1
		<i>T+</i>	0.26	0.05-1.35	0.110				
		additive model	1.32	0.70-2.47	0.385				
<i>APOE</i>	rs769449	<i>A/A*</i>	-	-	-				
		<i>A/G</i>	0.84	0.32-2.25	0.736				
		<i>G/G</i>	0.28	0.14-0.57	<0.000	0.0002	BMC		
		<i>A+</i>	3.55	1.76-7.19	<0.000	0.0002	BMC	1	1
		<i>G+*</i>	-	-	-				
		additive model	3.49	1.80-6.76	<0.000	0.0002	BMC		
<i>BINI-CYP27C1</i>	rs6733839	<u><i>C/C</i></u>	0.55	0.29-1.05	<u>0.070</u>		BMC, $\epsilon 4$		
		<i>C/T</i>	1.30	0.70-2.41	0.406				
		<i>T/T</i>	1.96	0.76-5.05	0.165				
		<i>C+</i>	0.51	0.20-1.32	0.165			0.281	0.865
		<u><i>T+</i></u>	1.81	0.95-3.43	<u>0.070</u>		BMC, $\epsilon 4$		
	additive model	1.62	1.01-2.59	0.045	0.049	BMC, $\epsilon 4$			
	rs744373	<i>A/A</i>	0.69	0.36-1.29	0.246				
		<i>A/G</i>	0.98	0.51-1.86	0.948				
		<i>G/G</i>	2.83	1.04-7.66	0.041	0.049	$\epsilon 4$	0.242	0.856
		<u><i>A+</i></u>	0.32	0.10-1.0	<u>0.051</u>		BMC, $\epsilon 4$		
<i>G+</i>		1.45	0.77-2.74	0.246					
additive model	1.55	0.96-2.51	<u>0.076</u>		BMC, $\epsilon 4$				
<i>CD2AP</i>	rs1094836 3	<i>A/A</i>	1.03	0.56-1.89	0.934				
		<i>A/G</i>	0.85	0.46-1.58	0.604				
		<i>G/G</i>	2.18	0.48-9.83	0.310				
		<i>A+</i>	0.46	0.10-2.06	0.310			0.323	0.833
		<i>G+</i>	0.97	0.53-1.80	0.934				
		additive model	1.08	0.64-1.83	0.766				

REGION	SNP		O.R.	C.I. [95%]	P	Pc [#]	I.V.	HWE	
								CON	PAT
<i>CD33</i>	rs3865444	<i>A/A</i>	1.04	0.34-3.17	0.950				
		<i>A/C</i>	1.12	0.60-2.07	0.723				
		<i>C/C</i>	0.88	0.48-1.64	0.695			0.524	0.063
		<i>A+</i>	1.13	0.61-2.10	0.695				
		<i>C+</i>	0.96	0.31-2.95	0.950				
		additive model	1.09	0.67-1.77	0.736				
<i>CELF1</i>	rs10838725	<i>C/C</i>	0.21	0.04-0.99	0.049	0.049	BMC, $\epsilon 4$		
		<i>C/T</i>	1.48	0.80-2.75	0.212				
		<i>T/T</i>	0.95	0.52-1.75	0.875				
		<i>C+</i>	1.05	0.57-1.93	0.875			0.660	0.110
		<i>T+</i>	4.88	1.01-23.60	0.049	0.049	BMC, $\epsilon 4$		
		additive model	0.83	0.50-1.36	0.453				
<i>CLU</i>	rs11136000	<i>C/C</i>	1.01	0.52-1.95	1.950				
		<i>C/T</i>	0.92	0.50-1.70	0.800				
		<i>T/T</i>	1.15	0.48-2.77	0.750				
		<i>C+</i>	0.87	0.36-2.08	0.750			0.121	0.129
		<i>T+</i>	0.99	0.51-1.90	0.974				
		additive model	1.03	0.65-1.65	0.883				
<i>CTNNA2</i>	rs2974151	<i>C/C</i>	1.21	0.59-2.47	0.601				
		<i>C/G</i>	0.79	0.38-1.63	0.521				
		<i>G/G</i>	1.67	0.12-23.27	0.703				
		<i>C+</i>	0.60	0.04-8.35	0.703			1	1
		<i>G+</i>	0.83	0.40-1.69	0.601				
		additive model	0.88	0.46-1.69	0.703				
<i>EPHA1</i>	rs11771145	<i>A/A</i>	1.00	0.41-2.49	0.992				
		<i>A/G</i>	0.68	0.37-1.26	0.218				
		<i>G/G</i>	1.48	0.79-2.74	0.217				
		<i>A+</i>	0.68	0.36-1.26	0.217			0.687	0.065
		<i>G+</i>	0.99	0.40-2.46	0.992				
		additive model	0.82	0.52-1.28	0.375				
<i>INPP5D</i>	rs35349669	<i>C/C</i>	1.74	0.96-3.15	<u>0.065</u>		BMC		
		<i>C/T</i>	0.68	0.37-1.25	0.210				
		<i>T/T</i>	0.76	0.31-1.87	0.556				
		<i>C+</i>	1.31	0.53-3.20	0.556			0.843	1
		<i>T+</i>	0.58	0.31-1.09	0.091				
		additive model	0.70	0.45-1.11	0.131				
<i>MS4A6A</i>	rs610932	<i>G/G</i>	1.01	0.53-1.93	0.966				
		<i>G/T</i>	0.87	0.47-1.61	0.650				
		<i>T/T</i>	1.28	0.55-2.99	0.573				
		<i>G+</i>	0.78	0.33-1.83	0.573			1	1
		<i>T+</i>	0.99	0.52-1.87	0.966				
		additive model	1.06	0.68-1.66	0.790				

REGION	SNP		O.R.	C.I. [95%]	P	Pc#	I.V.	HWE	
								CON	PAT
<i>PICALM</i>	rs3851179	<i>C/C</i>	1.37	0.73-2.55	0.319				
		<i>C/T</i>	0.74	0.40-1.38	0.351				
		<i>T/T</i>	0.95	0.35-2.60	0.918				
		<i>C+</i>	1.05	0.38-2.89	0.918			0.671	0.855
		<i>T+</i>	0.73	0.39-1.35	0.319				
		additive model	0.82	0.52-1.32	0.423				
<i>ZCWPWI</i>	rs1476679	<i>C/C</i>	0.71	0.16-3.08	0.644				
		<i>C/T</i>	1.31	0.69-2.51	0.408				
		<i>T/T</i>	0.82	0.44-1.54	0.544				
		<i>C+</i>	1.21	0.65-2.27	0.544			0.568	1
		<i>T+</i>	1.41	0.32-6.17	0.644				
		additive model	1.10	0.65-1.85	0.732				
<i>PTK2B</i>	rs28834970	<i>C/C</i>	1.35	0.56-3.28	0.507				
		<i>C/T</i>	0.84	0.46-1.56	0.588				
		<i>T/T</i>	1.03	0.55-1.91	0.935				
		<i>C+</i>	0.97	0.52-1.81	0.935			0.837	1
		<i>T+</i>	0.74	0.30-1.80	0.507				
		additive model	1.06	0.68-1.66	0.783				
<i>SLC24A4</i>	rs10498633	<i>G/G</i>	0.91	0.47-1.76	0.781				
		<i>G/T</i>	1.23	0.62-2.43	0.550				
		<i>T/T</i>	0.46	0.07-3.05	0.421				
		<i>G+</i>	2.17	0.33-14.40	0.421			0.320	0.166
		<i>T+</i>	1.10	0.57-2.13	0.781				
		additive model	0.99	0.56-1.76	0.984				
<i>SNCA</i>	rs3857059	<i>A/A</i>	1.59	0.75-3.37	0.227				
		<u><i>A/G</i></u>	0.46	0.21-1.04	<u>0.061</u>				
		<i>G/G</i>	1.95	0.20-18.96	0.563				
		<i>A+</i>	0.51	0.05-4.96	0.563				
		<i>G+</i>	0.67	0.30-1.47	0.318				
		additive model	0.91	0.51-1.62	0.740			Schooling, BMC, AD in family	0.236

The values are results of logistic regression performed by STATA. In bold: significant P-value; in underline: trend; OR - odds ratio; CI - confidence interval; P - P-value; Pc# - P-value correct for false discovery rate; I.V. - independent variable; HWE - Hardy-Weinberg equilibrium; PAT - Patients; CON - Controls; BMC - Body mass composition; * - It is not possible to calculate since all the controls have the rs769449*G allele. ABCA7 - ATP binding cassette subfamily A member 7; ADAMTS9-AS2 - ADAMTS9 antisense RNA 2; APOE - Apolipoprotein E; BIN1 - Bridging integrator 1; CYP27C1 - Cytochrome P450 family 27 subfamily C member 1; CD2AP - CD2 associated protein; CD33 - CD33 molecule; CELF1 - CUGBP Elav-like family member 1; CLU - Clusterin; CTNNA2 - Catenin alpha 2; EPHA1 - EPH receptor A1; INPP5D - Inositol polyphosphate-5-phosphatase D; MS4A6A - Membrane spanning 4-domains A6A; PICALM - Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein; ZCWPW1 - Zinc finger CW-type and PWWP domain containing 1; PTK2B - Protein tyrosine kinase 2 beta; SLC24A4 - Solute carrier family 24 member 4; SNCA - Synuclein alpha.

SUPPLEMENTARY TABLE 3 – LINKAGE DISEQUILIBRIUM ANALYSIS

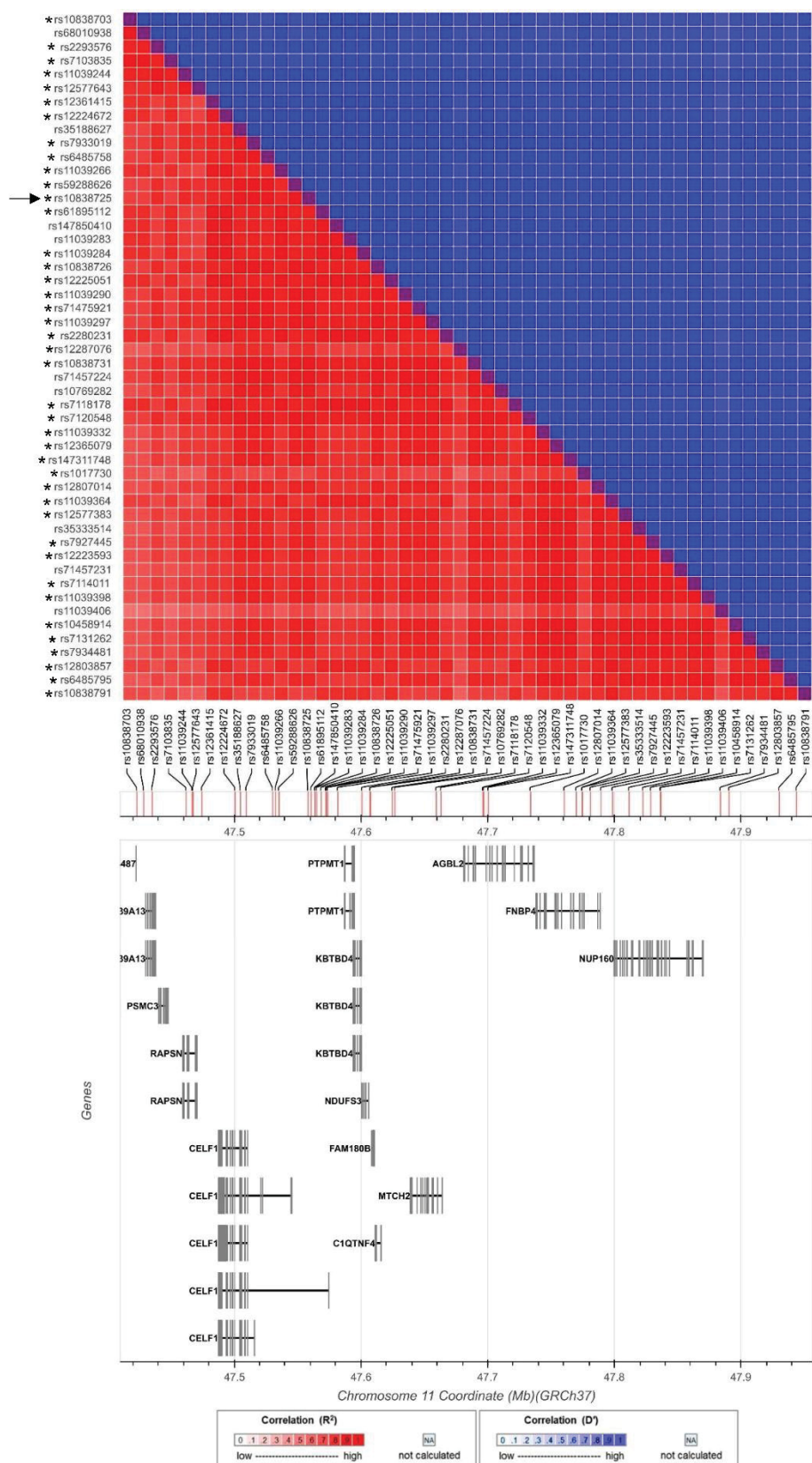
ID	REGION	ALLELES	POSITION	CEU			TSI			IBS			CORRELATED ALLELES	eQTL/ sQTL#
				MAF (%)	D'	r ²	MAF (%)	D'	r ²	MAF (%)	D'	r ²		
				34	Ref.	Ref.	34	Ref.	Ref.	29	Ref.	Ref.		
rs10838725	<i>CELF1</i>	T/C	Intron	34	Ref.	Ref.	34	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	T=C,C=G	X	
rs10838726	<i>CELF1</i>	C/G	Intron	34	1	1	34	1	1	1	1	T=C,C=G	X	
rs11039290	<i>CELF1</i>	G/A	Intron	34	1	1	34	1	1	1	1	T=G,C=A	X	
rs71475921	<i>CELF1</i>	G/A	Intron	34	1	1	34	1	1	1	1	T=G,C=A	X	
rs59288626	<i>CELF1</i>	CT/-	Intron	34	1	1	33	1	0.979	1	1	T=CT,C=-	X	
rs11039297	<i>CELF1</i>	G/A	Intron	34	1	1	34	1	1	1	1	T=G,C=A	X	
rs7933019	<i>CELF1</i>	G/C	Intron	34	1	1	34	1	0.979	1	1	T=G,C=C	X	
rs10838731	<i>NDUFS3 - FAM180B</i>	C/T	Intergenic	34	1	1	34	1	1	1	1	T=C,C=T	X	
rs71457224*	<i>C10TNF4 - MTC2</i>	-/T	Intergenic	34	1	1	34	1	1	1	1	T=-,C=T	No	
rs7120548	<i>MTC2</i>	T/C	Intron	34	1	1	34	1	1	1	1	T=T,C=C	X	
rs6485758	<i>CELF1</i>	G/A	Intron	34	1	0.978	34	1	0.979	1	1	T=G,C=A	X	
rs35188627	<i>CELF1</i>	A/-	Intron	33	1	0.978	34	1	1	0.977	0.977	T=A,C=-	No	
rs10769282*	<i>C10TNF4 - MTC2</i>	T/G	Intergenic	32	1	0.912	32	1	0.939	1	0.955	T=T,C=G	No	
rs11039332	<i>AGBL2</i>	G/A	Intron	33	0.954	0.890	33	0.978	0.918	1	0.977	T=G,C=A	X	
rs12365079	<i>AGBL2</i>	A/T	Intron	33	0.954	0.890	33	0.978	0.918	1	0.977	T=A,C=T	X	
rs147311748	<i>AGBL2</i>	G/T	Intron	33	0.954	0.890	33	0.978	0.918	1	0.977	T=G,C=T	X	
rs12807014	<i>FNBP4</i>	T/C	Intron	33	0.954	0.890	32	0.978	0.898	1	0.955	T=T,C=C	X	
rs12577383	<i>FNBP4</i>	C/T	Intron	33	0.954	0.890	32	0.978	0.898	1	0.955	T=C,C=T	X	
rs7927445	<i>FNBP4</i>	G/T	Intron	33	0.954	0.890	32	0.978	0.898	1	0.955	T=G,C=T	X	
rs12223593	<i>FNBP4</i>	T/G	Regulatory region	33	0.954	0.890	32	0.978	0.898	1	0.955	T=T,C=G	X	
rs7114011	<i>NUPI60</i>	A/C	Intron	33	0.954	0.890	32	0.978	0.898	1	0.955	T=A,C=C	X	
rs11039398	<i>NUPI60</i>	C/T	Intron	33	0.954	0.890	32	0.978	0.898	1	0.955	T=C,C=T	X	
rs7934481	<i>NUPI60 - PTPRJ</i>	C/T	Intergenic	33	0.954	0.890	32	0.956	0.858	0.977	0.933	T=C,C=T	X	
rs12287076	<i>NDUFS3 - FAM180B</i>	G/C	Intergenic	31	1	0.871	32	1	0.939	-	-	T=C,C=G	X	
rs35333514	<i>FNBP4</i>	-/AAAC	Intron	33	0.953	0.869	34	0.916	0.821	1	0.955	T=-,C=AAAC	No	

rs10458914	<i>NUPI60</i>	G/A	Intron	33	0.953	0.869	32	0.978	0.898	28	1	0.955	T=G,C=A	X
rs7131262	<i>NUPI60</i>	T/A	Intron	33	0.953	0.869	32	0.978	0.898	28	1	0.955	T=T,C=A	X
rs61895112	<i>CELF1</i>	T/C	Intron	30	1	0.850	33	1	0.979	27	1	0.890	T=T,C=C	X
rs147850410	<i>CELF1</i>	G/A	Intron	30	1	0.850	33	1	0.979	27	1	0.890	T=G,C=A	No
rs11039283	<i>CELF1</i>	G/A	Intron	30	1	0.850	33	1	0.979	27	1	0.890	T=G,C=A	No
rs11039284	<i>CELF1</i>	A/G	Intron	30	1	0.850	33	1	0.979	27	1	0.890	T=A,C=G	X
rs12225051	<i>CELF1</i>	C/T	Intron	30	1	0.850	33	1	0.979	27	1	0.890	T=C,C=T	X
rs2280231	<i>NDUFS3</i>	C/T	5'UTR	30	1	0.850	33	1	0.979	27	1	0.890	T=C,C=T	X
rs7118178	<i>MTCH2</i>	G/A	Intron	30	1	0.850	33	1	0.979	27	1	0.890	T=G,C=A	X
rs11039244	<i>RAPSN</i>	G/A	Intron	38	1	0.839	35	0.979	0.90	32	1	0.876	T=G,C=A	X
rs2293576	<i>SLC39A13</i>	G/A	Exon	38	1	0.839	35	0.979	0.900	31	0.977	0.853	T=G,C=A	X
rs12224672	<i>CELF1</i>	C/T	Intron	30	1	0.830	33	1	0.979	27	1	0.890	T=C,C=T	X
rs12361415	<i>RAPSN-CELF1</i>	T/G	Intergenic	31	0.975	0.828	35	0.979	0.919	27	1	0.890	T=T,C=G	X
rs6485795	<i>NUPI60-PTPRJ</i>	G/A	Intergenic	32	0.952	0.827	33	0.957	0.878	29	0.977	0.933	T=G,C=A	X
rs12577643	<i>RAPSN</i>	A/T	Intron	37	0.976	0.817	32	0.956	0.858	32	1	0.876	T=A,C=T	X
rs11039266	<i>CELF1</i>	T/G	Intron	30	0.975	0.808	34	0.979	0.939	27	1	0.890	T=T,C=G	X
rs11039406	<i>NUPI60</i>	C/T	Intron	31	0.951	0.807	33	X	X	28	X	X	T=C,C=T	No
rs71457231	<i>FNBP4-NUPI60</i>	-/T	Intergenic	32	0.929	0.806	32	0.956	0.858	28	0.953	0.868	T=-,C=T	No
rs7103835	<i>RAPSN</i>	G/A	Intron	34	x	x	35	0.957	0.880	29	X	X	T=G,C=A	X
rs68010938	<i>SLC39A13</i>	A/-	Intron	34	x	x	35	0.957	0.880	29	X	X	T=A,C=-	No
rs11039364	<i>FNBP4</i>	C/T	Intron	30	x	x	32	0.978	0.878	26	1	0.869	T=C,C=T	X
rs10838703	<i>SLC39A13</i>	C/G	Intron	35	x	x	35	0.957	0.861	29	X	X	T=C,C=G	X
rs12803857	<i>NUPI60-PTPRJ</i>	G/A	Intergenic	30	x	x	32	0.956	0.839	27	0.975	0.847	T=G,C=A	X
rs10838791	<i>NUPI60-PTPRJ</i>	C/T	Intergenic	27	x	x	32	0.956	0.839	28	0.928	0.804	T=C,C=T	X
rs1017730	<i>AGBL2</i>	G/A	Intron	27	x	x	29	X	X	25	1	0.807	T=G,C=A	X
rs769449 – APOE (G/A)														
rs769449	<i>APOE</i>	G/A	Intron	15	Ref.	Ref.	9	Ref.	Ref.	8	Ref.	Ref.	Ref.	X
rs10414043*	<i>AC011481.4</i>	G/A	Non-coding	14	1	1	10	1	0.895	8	1	1	G=G,A=A	X
rs7256200*	<i>AC011481.4</i>	G/T	Non-coding	14	1	0.960	10	1	0.895	8	1	1	G=G,A=T	No
rs429358*	<i>APOE</i>	T/C	Exon	18	x	x	10	1	0.850	14	x	x	G=T,A=C	X
rs6733839 – BIN1-CYP27C1 (C/T)														
rs6733839	<i>BIN1-CYP27C1</i>	C/T	Intergenic	40	Ref.	Ref.	42	Ref.	Ref.	31	Ref.	Ref.	Ref.	No

rs4663105*	<i>BINI-CYP27C1</i>	A/C	Intergenic	43	1	0.865	43	1	0.944	36	1	0.828	C=A,T=C	X
rs744373 – <i>BINI-CYP27C1</i> (A/G)														
rs744373*	<i>BINI-CYP27C1</i>	A/G	Intergenic	30	Ref.	Ref.	29	Ref.	Ref.	25	Ref.	Ref.	Ref.	No
rs730482*	<i>BINI-CYP27C1</i>	A/T	Intergenic	30	1	1	29	1	1	25	1	1	A=A, G=T	No

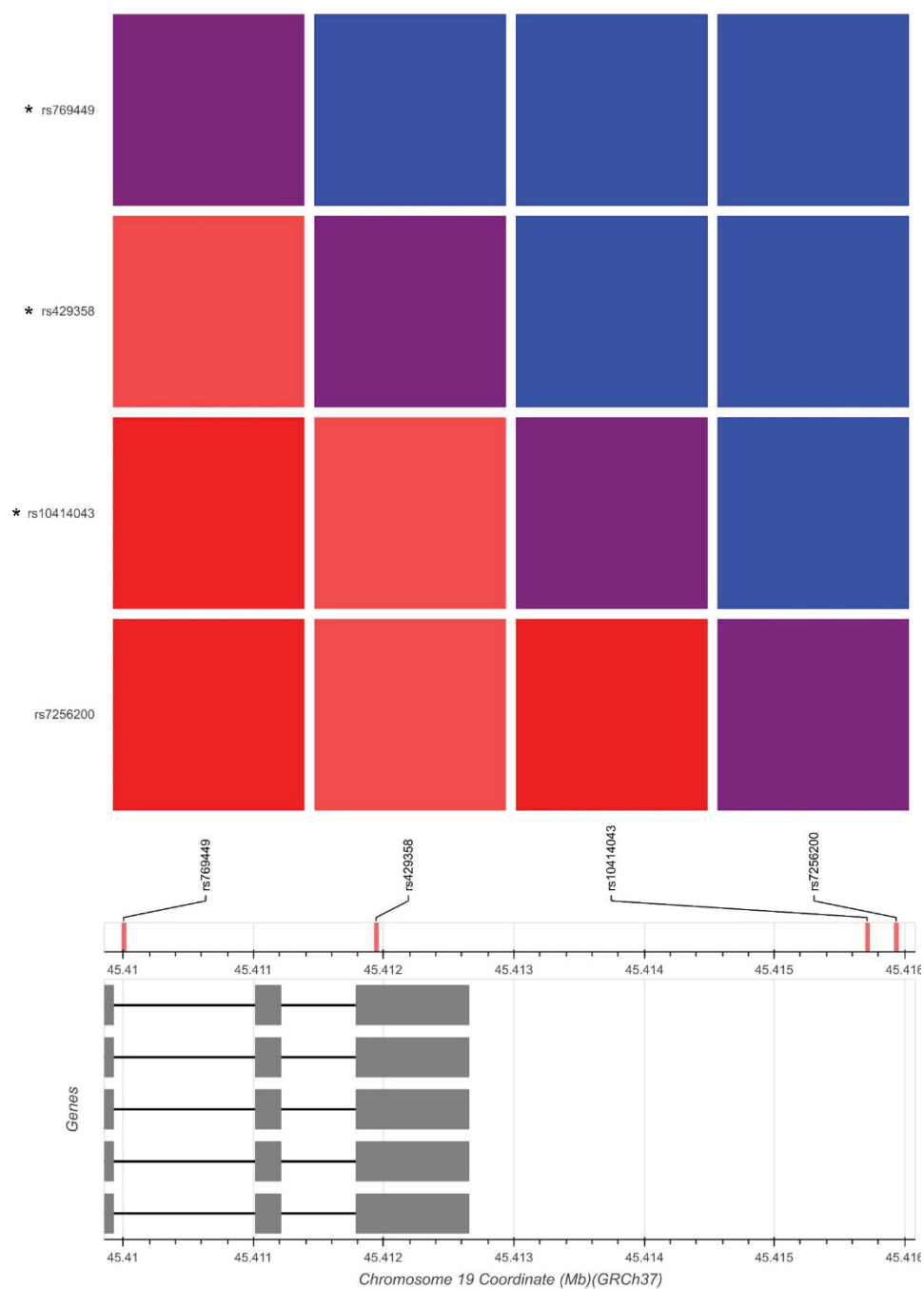
The variants marked with (*) are present in the long noncoding RNA (lncRNA) region; # - variant that has an expression and or splicing quantitative trait locus (eQTL / sQTL) effect on the brain or whole blood; Populations of: CEU - Utah with northern and western European ancestry; TSI – Toscana; IBS – Iberian; MAF – minor allele frequency; *CELF1* - *CUGBP Elav-like family member 1*; *NDUFS3* - *NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit S3*; *FAM180B* - *Family with sequence similarity 180 member B*; *C1QTNF4* – *C1q and TNF related 4*; *MTCH2* – *Mitochondrial carrier 2*; *AGBL2* – *ATP/GTP binding protein like 2*; *FNBP4* – *Formin binding protein 4*; *NUP160* - *Nucleoporin 160*; *TPRJ* – *Protein tyrosine phosphatase receptor type J*; *SLC39A13* – *Solute carrier family 39 member 13*; *APOE*- *Apolipoprotein E*; *BIN1*- *Bridging integrator 1*; *CYP27C1* - *Cytochrome P450 family 27 subfamily C member 1*.

SUPPLEMENTARY FIGURE 1 – VARIANTS IN LINKAGE DISEQUILIBRIUM WITH RS10838725



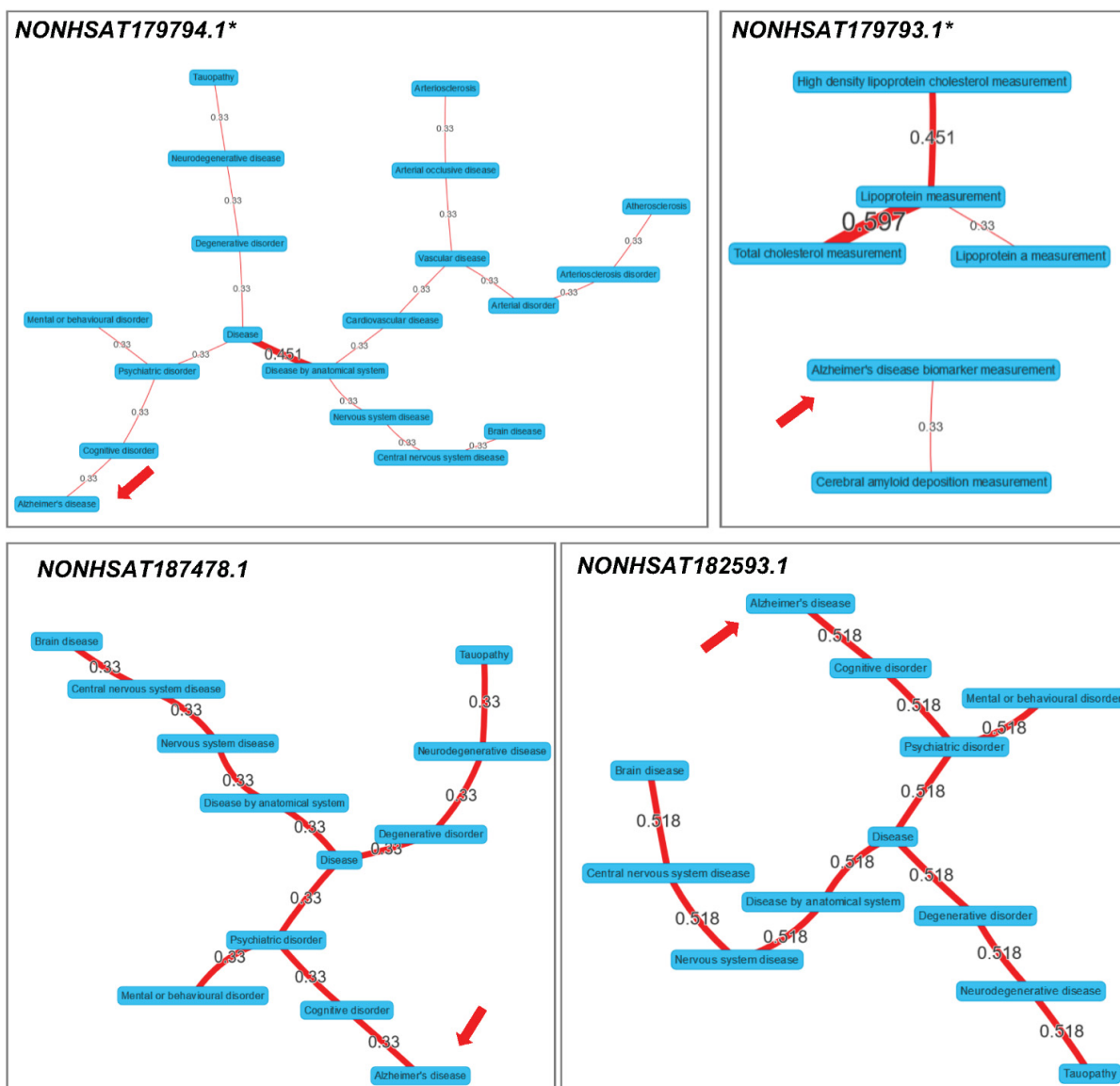
The variants marked with (*) have an expression and or splicing quantitative trait locus (eQTL / sQTL) effect on the brain or whole blood. The LD block was created based in three populations: CEU - Utah with northern and western European ancestry; TSI – Toscana; IBS – Iberian.

SUPPLEMENTARY FIGURE 2 – VARIANTS IN LINKAGE DISEQUILIBRIUM WITH RS769449



The variants marked with (*) have an expression and or splicing quantitative trait locus (eQTL / sQTL) effect on the brain or whole blood. The LD block was created based in three populations: CEU - Utah with northern and western European ancestry; TSI – Toscana; IBS – Iberian.

SUPPLEMENTARY FIGURE 3 – NETWORK OF DISEASES ASSOCIATIONS AND LncRNAs



* The network of these lncRNAs is not being shown in full because it is extensive, we focus on brain diseases. These networks were generated through ncRPheno, a comprehensive database that provides experimentally supported associations between noncoding RNAs and disease phenotypes.

8 CAPÍTULO 3 – SISTEMA COMPLEMENTO E NETS EM DA

NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS: A PERSPECTIVE OF NEUROINFLAMMATION AND COMPLEMENT ACTIVATION IN ALZHEIMER'S DISEASE

Gabriela Canalli Kretzschmar^{1#}; Valéria Bumiller-Bini^{1#}; Miguel Angelo Gasparetto Filho¹; Yohan Ricci Zonta³; Kaio Shu Tsyu Yu³; Ricardo Lehtonen R. de Souza²; Luciane Alarcão Dias-Melício^{3,4}; Angelica Beate Winter Boldt^{1*}

¹Human Molecular Genetics Laboratory, Postgraduate Program in Genetics, Department of Genetics, Federal University of Paraná (UFPR), Curitiba, Paraná State, Brazil.

²Polymorphism and Linkage Laboratory, Department of Genetics, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná State, Brazil.

³São Paulo State University (UNESP), Medical School of Botucatu, Laboratory of Immunopathology and Infectious Agents - LIAI, UNIPEX - Experimental Research Unity, Sector 5, Botucatu, São Paulo State, Brazil.

⁴ São Paulo State University (UNESP), Medical School of Botucatu, Department of Pathology, Botucatu, São Paulo State, Brazil.

both are first authors.

*** Correspondence:**

Prof. Dr. Angelica Beate Winter Boldt

Departamento de Genética

Universidade Federal do Paraná

Caixa Postal 19071; CEP: 81531-980 Curitiba, Brasil

Tel: +55 (41) 3361-1553, 3361-1724

e-mail: angelicaboldt@gmail.com

8.1 ABSTRACT

Complement system (CS) components are associated with Alzheimer's disease (AD), the commonest cause of dementia in the world. Neutrophils can be attracted to amyloid- β plaques by several pro-inflammatory factors, including the complement anaphylatoxin C5a. They may release extracellular neutrophil traps (NETs), which are chromatin nets associated with myeloperoxidase, elastase, and other enzymes. Some CS molecules, such as C5a, C1q, and CR1, are associated with increased neutrophil recruitment and NETs release. However, the relationship between CS molecules and NETs in AD is poorly understood. In this work, we detected higher NET concentrations in plasma and serum of Brazilian AD patients, than in elderly controls (medians = 2.78 [2.07 - 6.19] vs. 2.23 [0.33 - 4.14] ng/mL, $P = 0.0005$). We discussed these results within the context of our former findings on complement and AD and the context of the literature on complement and NET release, suggesting both as possible therapeutic targets to prevent the progress of the disease.

Keywords: Alzheimer's disease, neutrophil extracellular traps, inflammation, complement system, CR1, C5a, C1q.

8.2 INTRODUCTION

Neuroinflammation is a well-established phenomenon in AD (WYSS-CORAY; ROGERS, 2012; CZIRR; WYSS-CORAY, 2012; DANSOKHO; HENEKA, 2018; KLOSKE; WILCOCK, 2020) whose mechanisms are still poorly understood. They are related to the accumulation of amyloid- β ($A\beta$) plaques and neurofibrillary tangles (NFTs), characteristic AD biomarkers. The first present damage-associated molecular patterns (DAMPs) (WYSS-CORAY; ROGERS, 2012; HEPPNER et al., 2015) which are recognized by the complement system (CS) (MCGEER et al., 1989; VEERHUIS et al., 2011; TENNER et al., 2018). They also induce the expression of endothelial adhesion molecules and the release of pro-inflammatory cytokines by stimulated glial cells (reviewed in Pietronigro et al., 2017). Indeed, the CS appears to play a relevant role in AD, as judged by the strong association of complement genetic polymorphisms with this disease (MORGAN, 2018; KRANCE et al., 2019; TENNER, 2020; KRETZSCHMAR et al., 2020). Besides that, the CS has already been correlated with the formation of extracellular neutrophil traps (NETs) (PALMER et al., 2016; BONT, DE et al., 2019). NETs are composed of chromatin fibers, citrullinated histones, and cytoplasmic enzymes as myeloperoxidase (MPO) and neutrophil elastase (NE), which altogether operate as an extracellular platform for trapping and killing bacteria (BRINKMANN et al., 2004; YOUSEFI et al., 2009). They have been observed in AD patients and an AD animal model (ZENARO et al., 2015; DONG et al., 2018). However, the possible role of the CS in NET release within AD has never been discussed before. In this study, we focused on reported interactions of the CS with $A\beta$ plaques and their possible role in neutrophil recruitment and NETs release in AD. We also confirmed the presence of higher NET levels in an AD Brazilian cohort.

8.3 ALZHEIMER'S DISEASE AND THE COMPLEMENT SYSTEM

AD is a neurodegenerative disease responsible for the largest number of dementia cases globally (ALZHEIMER'S-ASSOCIATION, 2020). Several authors sought to understand the disease's etiology by analyzing different pathways and metabolic processes, most of them causing or being influenced by neuroinflammation (ZLOKOVIC, 2011; HEPPNER et al., 2015; DU et al., 2018). In AD, the production of $A\beta$ plaques and NFTs are exacerbated. The accumulation of $A\beta$ plaques in the

extracellular environment causes the loss of interneural communication (synapses) and activates the local and systemic immunological responses since A β plaques can be recognized as DAMPs by phagocytic cells (WYSS-CORAY; ROGERS, 2012; CZIRR; WYSS-CORAY, 2012; HEPPNER et al., 2015) and activate the CS (MCGEER et al., 2016).

The CS is considered a key element in innate immunity, playing an essential role in regulating and protecting the central nervous system. The CS consists of an enzymatic cascade with the participation of more than 50 circulating proteins, as well as soluble or membrane receptors and regulators (LEE et al., 2019). It can be activated by three different pathways: classical (CP), lectin (LP), and alternative (AP). For more information on activation and participating CS elements, consult the review of Ricklin et al., 2016. Although the complement pathways are activated in different ways, they all enhance phagocytic activity and may progress to the formation of membrane attack complexes (MAC), leading to cell lysis. In addition, the activation of the complement cascade also results in anaphylatoxin production and recruitment of inflammatory cells. The CS must be tightly regulated. If out of control, the cascade may become offensive, permanently injuring surrounding tissues (RICKLIN et al., 2016).

It is not a novelty that CS components and genetic polymorphisms are associated with AD (MCGEER et al., 1989; WEBSTER et al., 1997; LOEFFLER et al., 2008), as complement component 3 (STOLTZNER et al., 2000; reviewed by WYSS-CORAY and ROGERS, 2012; GOETZL et al., 2018), complement component 4 (reviewed in WYSS-CORAY and ROGERS, 2012; GOETZL et al., 2018), complement membrane complex C5b-C9 (GOETZL et al., 2018), complement component 3a (C3a) and its receptor C3aR (LIAN et al., 2015; LITVINCHUK et al., 2018), complement component 5a (C5a) and its receptor C5aR1 (AN et al., 2018), complement receptor 1 (CR1) (LAMBERT et al., 2009; KRETZSCHMAR et al., 2020), clusterin (CLU) (LAMBERT et al., 2009) and complement component 1q (C1q) (STOLTZNER et al., 2000; reviewed in WYSS-CORAY AND ROGERS, 2012; LIAN et al., 2016; MCGEER et al., 2016; DEJANOVIC et al., 2018; GOETZL et al., 2018), complement component 9 (reviewed in WYSS-CORAY and ROGERS, 2012), factor B and factor D (GOETZL et al., 2018). In this work, we will focus only on the CS components associated with AD, which may be related to the recruitment of neutrophils and the formation of NETs (Figure 1).

8.4 ALZHEIMER'S DISEASE AND NETS

Neutrophils have an essential role in inflammation, acting through many mechanisms: phagocytosis, degranulation, and extrusion of NETs (reviewed in SHEN et al., 2001; ROSSI et al., 2020). NETs are involved in host tissue injury and inflammation associated with autoimmune diseases, acute injuries, atherosclerosis, vasculitis, and cancer (JORCH; KUBES, 2017). In 2015, Zenaro and colleagues observed NETs adjacent to A β plaque deposits in the cerebral vascular and intraparenchymal region of an AD animal model and European AD patients. They suggested that A β plaques may play an essential role in the recruitment and movement of neutrophils, which Baik and colleagues (2014) also observed in an AD animal model. Furthermore, NET extrusion was also detected in high concentrations in European AD patients' serum (DONG et al., 2018).

8.4.1 C5a-C5aR1 axis and the relation with NETs and AD

After complement activation (MCGEER et al., 1989; VEERHUIS et al., 2011), C3 and C5 are cleaved, generating the anaphylatoxins C3a and C5a (reviewed in de Bont et al., 2019). C3a lacks chemotactic activity (EHRENGRUBER et al., 1994), but C5a generates a potent chemotactic response and induces neutrophil migration (EHRENGRUBER et al., 1994), as well as the release of NETs (reviewed in DE BONT et al., 2019). Therapeutic inhibitors blocking C5a and/ or its receptor C5aR1 have been proposed to treat AD (FONSECA et al., 2013; LANDLINGER et al., 2015; AN et al., 2018). Although the functional connection between high NET levels and C5a has been well described (YOUSEFI et al., 2009; HUANG et al., 2015; YUEN et al., 2016; FATTAHI et al., 2018; BONT, DE et al., 2019), it has never been explored in AD.

The CS seems to be, at least, through C5a, attracting neutrophils to the brain and inducing NETs extrusion. Neutrophil activation by C5a extrudes the mitochondrial DNA (YOUSEFI et al., 2009), which suggests that in AD, after NETs extrusion, the neutrophils do not die, at least not through C5a stimulation. NETs deposition trigger CS activation via the alternative pathway and properdin binding (YUEN et al., 2016). The neutrophils probably recognize the A β plaques and trap them, resulting in increased inflammation and tissue injury. Further triggering the neutrophils to the tissue, the CS may not degrade the NETs, resulting in tissue NET accumulation and

CS over-activation (BONT, DE et al., 2019). Thus, the use of C5a inhibitors may decrease NETs activation in AD.

8.4.2 CR1 and its relationship with NETs and AD

Even before NET's discovery, several authors sought to understand the mechanisms of interaction between the complement system and neutrophils. Cytokines as tumor necrosis factor-alpha (TNF α), granulocyte-monocyte and granulocyte colony stimulating factors (GM-CSF, G-CSF), interleukin 1(IL-1), platelet activating factor (PAF), and lymphotoxin-beta (LTB) up-regulate phagocytic complement 1 receptor (CR1, also known as CD35) in neutrophils, increasing its association with C3b-opsonized microspheres. However, only TNF α , G-CSF, and PAF increased their phagocytic uptake (OGLE et al., 1990). Besides that, CR1 recognizing C3b-IgG complexes on the neutrophil membrane led to changes in signal transduction events associated with Fc receptors, resulting in myeloperoxidase's release and generation hypochlorous acid (SAMBANDAM; CHATHAM, 1998). CR1 blockage is followed by a decrease in NET concentration, revealing an essential role of this molecule in the extrusion process (PALMER et al., 2016). Thus, recognition of C3b-opsonized particles by CR1 on neutrophil membranes may preferentially lead to the release of NETs instead of phagocytosis, although more studies are needed to corroborate this hypothesis.

Interestingly, increased AD susceptibility has been repeatedly associated with CR1 polymorphisms (LAMBERT et al., 2009). Nowadays, the hypothesis proposed for this association is that some polymorphisms (such as *rs6656401**A) facilitate non-homologous recombination resulting in the preferential expression of dysfunctional CR1*B isoform (BROUWERS et al., 2012; MAHMOUDI et al., 2015). Although CR1*B has an additional C3b/C4b binding site, its neuronal expression occurs in vesicular form (HAZRATI et al., 2012). It is also expressed in lower amounts in erythrocytes than the CR1*A functional protein (MAHMOUDI et al., 2018). Thus, CR1*B probably impairs the process of removing A β plates and regulating the CS (MAHMOUDI et al., 2018). Heterozygote CR1*A/CR1*B individuals express both isoforms. In this case, neutrophil recognition of C3b-opsonized A β plates may occur by CR1*A, with consequent release of NETs. CR1 can also be found in a soluble form (sCR1). AD patients have higher levels of sCR1 in serum (MAHMOUDI et al., 2018), plasma (KRETZSCHMAR et al.,

2020), and cerebrospinal fluid (CSF) (DABORG et al., 2012). sCR1 is a potent local inhibitor of the complement system and is formed through vesiculation or proteolysis of the membrane-bound CR1 (PASCUAL et al., 1993; DANIELSSON et al., 1994; DERVILLEZ et al., 1997; HAMER et al., 1998), inhibiting the CS by dissociating C3 convertases, and targeting C3b and C4b for degradation (ZHU et al., 2015). It is possible that large sCR1 quantities would inhibit complement's beneficial role of removing A β plaques, contributing to its accumulation. However, no studies to date demonstrated whether individuals who have only the CR1*B isoform present functional sCR1. If sCR1 is generated from CR1*B, CS inhibition probably will not occur properly, recruiting more neutrophils to the affected region, with higher extrusion of NETs, ultimately contributing to chronic neuroinflammation. Although CR1's participation in the increase of NETs release seems to be evident, it is not yet clear how this may be related to the different isoforms of the molecule and its association with Alzheimer's. Still, it raises an exciting possibility of a new role for CR1 in the disease, which needs to be investigated in further functional studies.

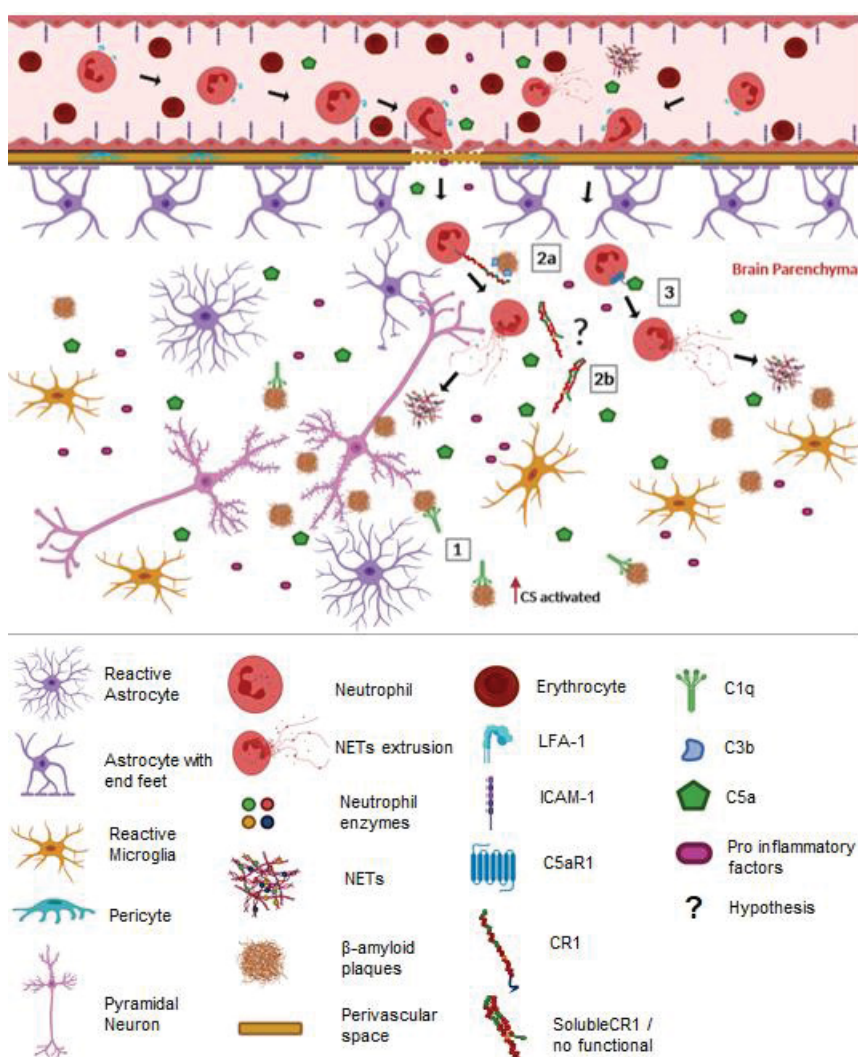
8.4.3 C1q and the relation with NETs and AD

The C1q molecule of the CP participates within an essential process in brain homeostasis. In periods when synapse pruning happens, C1q tags inappropriate connections between neurons for removal by the microglia (PRESUMEY et al., 2017). In neurodegenerative diseases, C1q may lead to aberrant synapse loss (DEJANOVIC et al., 2018). Curiously, A β binds and activates C1q in the absence of immunoglobulins (ROGERS et al., 1992), starting the CP and probably promoting synapse loss. A study with a mouse model of AD lacking C1q demonstrated a significant reduction in inflammation and neuropathological features (PRESUMEY et al., 2017).

Some researchers already analyzed the relationship between C1q and NETs. Increased C1q deposition inhibits DNase activity, resulting in NET accumulation (LEFFLER et al., 2012). When C1q is inhibited, the complement cascade does not progress, and NETs do not appear (HAIR et al., 2018). NETs are mainly degraded by endonuclease DNase1 (HAKKIM et al., 2010) and then cleared by macrophages (FARRERA; FADEEL, 2013). DNases have already been used to successfully treat AD in a case report (TETZ; TETZ, 2016). Genetic *DNASE1* variants already have been investigated in systemic lupus erythematosus (PRUCHNIAK et al., 2019), however, its

role in AD has never been investigated. DNase has been used as an efficient drug to degrade NET structure in breast cancer, lung injury, and lupus mouse models (reviewed in JORCH and KUBES, 2017).

FIGURE 1- POSSIBLE INVOLVEMENT OF THE COMPLEMENT SYSTEM IN THE RECRUITMENT OF NEUTROPHILS AND THE FORMATION OF NETS IN ALZHEIMER'S DISEASE (AD)



When the BBB is intact, most complement molecules do not pass through it but can be produced constitutively by brain cells. In AD, the BBB is compromised, facilitating the passage of complement elements, among other pro-inflammatory elements (Alexander, 2018). A β plaques are recognized as DAMPs by CS components and other innate immunity receptors, leading to the activation of BBB endothelial cells. They up-regulate ICAM-1 adhesion molecules, allowing neutrophils to adhere and circulate through interaction with LFA-1, that extravasate into the cerebral parenchyma (Pietronigro, 2017). When present in the cerebral parenchyma, these neutrophils worsen neuroinflammation, performing NET extrusion. In this sense, the CS may be involved through: (1) C1q binding to the A β plates, activating the cascade of the classical complement pathway; (2a) CR1 (CR1*A) molecules present in the neutrophil membrane recognize the A β plates opsonized with C3b fragments, preferentially leading to NET extrusion; (2b) molecules of soluble CR1, formed by non-functional isoforms (CR1*B) do not perform their function of inhibiting CS; (3) Potent anaphylatoxins such as C5a, can recruit neutrophils from the periphery to the A β plaque concentration site, and be recognized by the C5aR1 receptors present in the neutrophils, promoting the release of NETs. Although the participation of other elements of the inflammatory reaction occurs, in this figure, we focus on

elements of the complement system discussed throughout this study. The complement cascades' reactions were not represented due to space and number of elements participating in the pathways.

The role of cytokines and endothelial adhesion in neutrophil recruit for A β plaques is widely approached in Pietronigro et al., 2017 review. BBB- blood-brain barrier; A β - amyloid- β ; DAMPs- damage-associated molecular patterns; ICAM-1- Intercellular Adhesion Molecule 1; LFA-1- Lymphocyte function-associated antigen 1; NET- extracellular neutrophil traps; CS- complement system; C1q- complement component 1q; CR1- complement receptor 1; C3b- complement component 3b; C5a- complement component 5a; C5aR1- complement component 5a receptor. This figure was created with BioRender.com

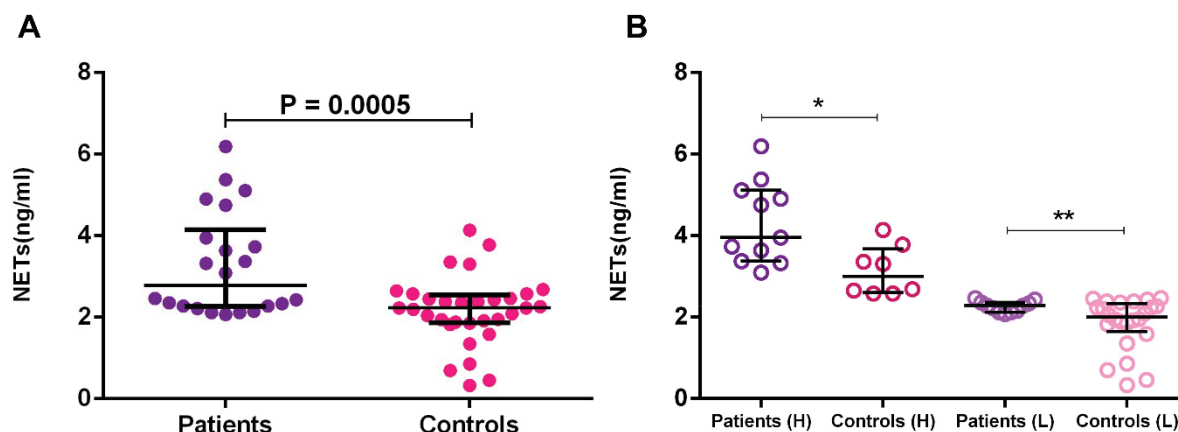
8.4.4 High NETs levels in a Brazilian cohort

Recently, we confirmed the genetic association of complement receptor 1 (CR1) polymorphisms in an AD Brazilian cohort (KRETZSCHMAR et al., 2020). Based on the association between molecules of the complement system and NETs, we aimed to investigate if NET levels are also increased within the same Brazilian cohort. We quantified NETs in plasma of 22 AD patients and 21 elderly controls (EC), and serum of another 12 EC (considering that NET levels are similar in serum and plasma of the same individual (ABRAMS et al., 2019)). The study was approved by the local ethics committee (CAAE 55965316.1.0000.0102). All participating individuals were older than 65 years (AD median = 82.5 [70- 88] years old; EC median = 76 [69-99] years old). AD were recruited from the Clinical Hospital of the Federal University of Paraná. AD and EC were diagnosed or confirmed to be healthy and neurologically normal based on clinical history and cognitive tests (FROTA et al., 2011). The NE-DNA concentrations in serum and plasma samples were quantified using an adapted ELISA test with immunofluorescence (CZAIKOSKI et al., 2016; COLÓN et al., 2019) (Supplementary figure1). Anti-Elastase antibodies were used for capturing these NE-DNA complexes, and dsDNA fluorescent reagent was used for detection and quantification. For the methodological details, see the Supplementary Material.

Our study brings, for the first time, higher circulating NET levels in AD Brazilian patients. In this work, we detected higher NET concentrations in plasma and serum of Brazilian AD patients, than in elderly controls (medians = 2.78 [2.07 - 6.19] vs. 2.23 [0.33 - 4.14] ng/mL, $P = 0.0005$). (Figure 2A). The difference remained after dichotomizing AD and EC into high- and low-NET producers. The median NET concentration of high-NET producers was 3.95 (3.09 - 6.19 ng/mL) in AD, compared to 3.0 (2.586 - 4.14 ng/mL) in EC ($P = 0.012$). For low-NET producers, the median level of AD was 2.28 (2.07 - 2.46 ng/mL), compared to 2.0 in EC (0.33 - 2.46 ng/mL) ($P =$

0.042) (Figure 2B). Although NETs extrusion can lead to cell death by NETosis, we did not perform the assays to evaluate it. Despite the small number of samples used here, few studies investigating NETs in AD patients were published. All of them confirm the increased NETs in AD (ZENARO et al., 2015; DONG et al., 2018).

FIGURE 2- NETs CONCENTRATION BETWEEN AD PATIENTS AND CONTROLS.



Differences in NETs concentration between: **A** –AD patients and elderly controls. **B** – AD patients and elderly controls in High (H) and Low (L) groups. *P = 0.0115; **P = 0.0422.

8.5 CONCLUDING REMARKS

NETs seem to be promising as new therapeutic targets for AD treatment. We propose more investigations into the connection between the C5a, C1q, and CR1 with NETs in AD, as well as genetic associations studies to investigate variants in DNase genes (*DNASE1*, *DNASE2*, and *DNASE1L3*) that can result in a down-regulation of DNase expression in AD.

8.6 ETHICS STATEMENT

All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the Research Ethics Committee of the Health Sciences Sector (Federal University of Paraná) (CAAE: 55965316.1.0000.0102), according to Resolution 466/ 2012 of the National Health Council and the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards. Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

8.7 ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PROAP – Finance Code 001) for financial support and the scholarships provided to GCK and VBB. We thank all study participants, especially the patients.

CONFLICT OF INTEREST: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS: ABWB, LADM, GCK contributed to the conception of the work. ABWB, MAG, VBB, GCK designed the study. RLRS provided the samples. LADM made available the infrastructure and material for the ELISA assay. MAG, YRZ and KSTY performed ELISA assay. ABWB, VBB, GCK did the statistical analysis. GCK and MAG made the illustrations. ABWB, MAG, VBB, GCK drafted the manuscript. All authors revised the work critically for intellectual content and approved the final version of the work.

FUNDING: This work was supported by grants of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior–Brasil (CAPES-40001016006P1) (GCK and VBB grants); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - 2018/09706-7). ABWB is a recipient of CNPq fellowship (CNPq-314288/2018-0). The funding agencies had no role in study design, in the collection, analysis, and interpretation of data, in the writing of the letter, and in the decision to submit it for publication.

8.8 REFERENCES

- Abrams, S. T., Morton, B., Alhamdi, Y., Alsabani, M., Lane, S., Welters, I. D., et al. (2019). A novel assay for neutrophil extracellular trap formation independently predicts disseminated intravascular coagulation and mortality in critically ill patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 200, 869–880. doi:10.1164/rccm.201811-2111OC.
- An, X. Q., Xi, W., Gu, C. Y., and Huang, X. (2018). Complement protein C5a enhances the β -amyloid-induced neuro-inflammatory response in microglia in Alzheimer's disease. *Medecine/Sciences* 34, 116–120. doi:10.1051/medsci/201834f120.
- Association, A. (2020). Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Dement.* 16, 391–460. doi:10.1002/alz.12068.
- Baik, S. H., Cha, M. Y., Hyun, Y. M., Cho, H., Hamza, B., Kim, D. K., et al. (2014). Migration of neutrophils targeting amyloid plaques in Alzheimer's disease mouse model. *Neurobiol. Aging* 35, 1286–1292. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2014.01.003.
- Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate : A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J.R. Stat. Soc. B* 57, 289–300.
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., et al. (2004). Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science (80-)*. 303, 1532–1535. doi:10.1126/science.1092385.
- Brouwers, N., Van Cauwenberghe, C., Engelborghs, S., Lambert, J.-C., Bettens, K., Le Bastard, N., et al. (2012). Alzheimer risk associated with a copy number variation in the complement receptor 1 increasing C3b/C4b binding sites. *Mol. Psychiatry* 17, 223–233. doi:10.1038/mp.2011.24.
- Colón, D. F., Wanderley, C. W., Franchin, M., Silva, C. M., Hiroki, C. H., Castanheira, F. V. S., et al. (2019). Neutrophil extracellular traps (NETs) exacerbate severity of infant sepsis. *Crit. Care* 23, 1–13. doi:10.1186/s13054-019-2407-8.
- Czai Koski, P. G., Mota, J. M. S. C., Nascimento, D. C., Sônego, F., Castanheira, F. V. E. S., Melo, P. H., et al. (2016). Neutrophil extracellular traps induce organ damage during experimental and clinical sepsis. *PLoS One* 11. doi:10.1371/journal.pone.0148142.
- Czirr, E., and Wyss-Coray, T. (2012). The immunology of neurodegeneration. *J. Clin.*

- Invest.* 122, 1156–1163. doi:10.1172/JCI58656.
- Daborg, J., Andreasson, U., Pekna, M., Lautner, R., Hanse, E., Minthon, L., et al. (2012). Cerebrospinal fluid levels of complement proteins C3, C4 and CR1 in Alzheimer's disease. *J. Neural Transm.* 119, 789–797. doi:10.1007/s00702-012-0797-8.
- Danielsson, C., Pascual, M., French, L., Steiger, G., and Schifferli, J.-A. (1994). Soluble complement receptor type 1 (CD35) is released from leukocytes by surface cleavage. *Eur. J. Immunol.* 24, 2725–2731. doi:10.1002/eji.1830241123.
- Dansokho, C., and Heneka, M. T. (2018). Neuroinflammatory responses in Alzheimer's disease. *J. Neural Transm.* 125, 771–779. doi:10.1007/s00702-017-1831-7.
- de Bont, C. M., Boelens, W. C., and Pruijn, G. J. M. (2019). NETosis, complement, and coagulation: a triangular relationship. *Cell. Mol. Immunol.* 16, 19–27. doi:10.1038/s41423-018-0024-0.
- Dejanovic, B., Huntley, M. A., De Mazière, A., Meilandt, W. J., Wu, T., Srinivasan, K., et al. (2018). Changes in the Synaptic Proteome in Tauopathy and Rescue of Tau-Induced Synapse Loss by C1q Antibodies. *Neuron* 100, 1322-1336.e7. doi:10.1016/j.neuron.2018.10.014.
- Dervillez, X., Oudin, S., Libyh, M. T., Tabary, T., Reveil, B., Philbert, F., et al. (1997). Catabolism of the human erythrocyte C3b/C4b receptor (CR1, CD35): vesiculation and/or proteolysis? *Immunopharmacology* 38, 129–140. doi:10.1016/S0162-3109(97)00066-0.
- Dong, Y., Lagarde, J., Xicota, L., Corne, H., Chantran, Y., Chaigneau, T., et al. (2018). Neutrophil hyperactivation correlates with Alzheimer's disease progression. *Ann. Neurol.* 83, 387–405. doi:10.1002/ana.25159.
- Du, X., Wang, X., and Geng, M. (2018). Alzheimer's disease hypothesis and related therapies. *Transl. Neurodegener.* 7, 2. doi:10.1186/s40035-018-0107-y.
- Ehrengruber, M. U., Geiser, T., and Deranleau, D. A. (1994). Activation of human neutrophils by C3a and C5A: Comparison of the effects on shape changes, chemotaxis, secretion, respiratory burst. *FEBS Lett.* 346, 181–184.
- Farrera, C., and Fadeel, B. (2013). Macrophage Clearance of Neutrophil Extracellular Traps Is a Silent Process. *J. Immunol.* 191, 2647–2656. doi:10.4049/jimmunol.1300436.
- Fattahi, F., Frydrych, L. M., Bian, G., Kalbitz, M., Herron, T. J., Malan, E. A., et al.

- (2018). Role of complement C5a and histones in septic cardiomyopathy. *Mol. Immunol.* 102, 32–41. doi:10.1016/j.molimm.2018.06.006.
- Fonseca, M. I., McGuire, S. O., Counts, S. E., and Tenner, A. J. (2013). Complement activation fragment C5a receptors, CD88 and C5L2, are associated with neurofibrillary pathology. *J. Neuroinflammation* 10, 1–12. doi:10.1186/1742-2094-10-25.
- Frota, N. A. F., Nitrini, R., Damasceno, B. P., Forlenza, O., Dias-Tosta, E., Silva, A. B. da, et al. (2011). Critérios para diagnóstico de doença de Alzheimer. *Dement. Neuropsychol.* 5, 5–10.
- Goetzl, E. J., Schwartz, J. B., Abner, E. L., Jicha, G. A., and Kapogiannis, D. (2018). High complement levels in astrocyte-derived exosomes of Alzheimer disease. *Ann. Neurol.* 83, 544–552. doi:10.1002/ana.25172.
- Hair, P. S., Enos, A. I., Krishna, N. K., and Cunnion, K. M. (2018). Inhibition of immune complex complement activation and neutrophil extracellular trap formation by peptide inhibitor of complement C1. *Front. Immunol.* 9, 1–12. doi:10.3389/fimmu.2018.00558.
- Hakim, A., Furnrohr, B. G., Amann, K., Laube, B., Abed, U. A., Brinkmann, V., et al. (2010). Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 9813–9818. doi:10.1073/pnas.0909927107.
- Hamer, I., Paccaud, J., Belin, D., Maeder, C., and Carpentier, J. (1998). Soluble form of complement C3b/C4b receptor (CR1) results from a proteolytic cleavage in the C-terminal region of CR1 transmembrane domain. *Biochem. J.* 329, 183–190.
- Hazrati, L. N., Van Cauwenberghe, C., Brooks, P. L., Brouwers, N., Ghani, M., Sato, C., et al. (2012). Genetic association of CR1 with Alzheimer's disease: A tentative disease mechanism. *Neurobiol. Aging* 33, 2949.e5-2949.e12. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2012.07.001.
- Heppner, F. L., Ransohoff, R. M., and Becher, B. (2015). Immune attack: The role of inflammation in Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 16, 358–372. doi:10.1038/nrn3880.
- Huang, Y. M., Wang, H., Wang, C., Chen, M., and Zhao, M. H. (2015). Promotion of hypercoagulability in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis by C5a-induced tissue factor-expressing microparticles and neutrophil extracellular

- traps. *Arthritis Rheumatol. (Hoboken, N.J.)* 67, 2780–2790.
doi:10.1002/art.39239.
- Jorch, S. K., and Kubes, P. (2017). An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nat. Med.* 23, 279–287. doi:10.1038/nm.4294.
- Kloske, C. M., and Wilcock, D. M. (2020). The Important Interface Between Apolipoprotein E and Neuroinflammation in Alzheimer's Disease. *Front. Immunol.* 11, 1–12. doi:10.3389/fimmu.2020.00754.
- Krance, S. H., Wu, C.-Y., Zou, Y., Mao, H., Toufighi, S., He, X., et al. (2019). The complement cascade in Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Mol. Psychiatry*. doi:10.1038/s41380-019-0536-8.
- Kretzschmar, G. C., Antoniazzi, A. A. H., Oliveira, L. C., Nisihara, R. M., Petzl-Erler, M. L., de Souza, R. L. R., et al. (2020). First Report of CR1 Polymorphisms and Soluble CR1 Levels Associated with Late Onset Alzheimer's Disease (LOAD) in Latin America. *J. Mol. Neurosci.* doi:10.1007/s12031-020-01547-2.
- Lambert, J.-C., Heath, S., Even, G., Campion, D., Sleegers, K., Hiltunen, M., et al. (2009). Genome-wide association study identifies variants at *CLU* and *CR1* associated with Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* 41, 1094–1099.
doi:10.1038/ng.439.
- Landlinger, C., Oberleitner, L., Gruber, P., Noiges, B., Yatsyk, K., Santic, R., et al. (2015). Active immunization against complement factor C5a: A new therapeutic approach for Alzheimer's disease. *J. Neuroinflammation* 12, 1–13.
doi:10.1186/s12974-015-0369-6.
- Lee, J. D., Coulthard, L. G., and Woodruff, T. M. (2019). Complement dysregulation in the central nervous system during development and disease. *Semin. Immunol.* 45, 101340. doi:10.1016/j.smim.2019.101340.
- Leffler, J., Martin, M., Gullstrand, B., Tydén, H., Lood, C., Truedsson, L., et al. (2012). Neutrophil Extracellular Traps That Are Not Degraded in Systemic Lupus Erythematosus Activate Complement Exacerbating the Disease. *J. Immunol.* 188, 3522–3531. doi:10.4049/jimmunol.1102404.
- Lian, H., Litvinchuk, A., Chiang, A. C.-A., Aithmitti, N., Jankowsky, J. L., and Zheng, H. (2016). Astrocyte-Microglia Cross Talk through Complement Activation Modulates Amyloid Pathology in Mouse Models of Alzheimer's Disease. *J. Neurosci.* 36, 577–589. doi:10.1523/JNEUROSCI.2117-15.2016.
- Lian, H., Yang, L., Cole, A., Sun, L., Chiang, A. C.-A., Fowler, S. W., et al. (2015).

- NFkB-Activated Astroglial Release of Complement C3 Compromises Neuronal Morphology and Function Associated with Alzheimer's Disease. *Neuron* 85, 101–115. doi:10.1016/j.neuron.2014.11.018.
- Litvinchuk, A., Wan, Y.-W., Swartzlander, D. B., Chen, F., Cole, A., Propson, N. E., et al. (2018). Complement C3aR Inactivation Attenuates Tau Pathology and Reverses an Immune Network Deregulated in Tauopathy Models and Alzheimer's Disease. *Neuron* 100, 1337-1353.e5. doi:10.1016/j.neuron.2018.10.031.
- Loeffler, D. A., Camp, D. M., and Bennett, D. A. (2008). Plaque complement activation and cognitive loss in Alzheimer's disease. *J. Neuroinflammation* 5, 1–8. doi:10.1186/1742-2094-5-9.
- Mahmoudi, R., Feldman, S., Kisserli, A., Duret, V., Tabary, T., Bertholon, L.-A., et al. (2018). Inherited and Acquired Decrease in Complement Receptor 1 (CR1) Density on Red Blood Cells Associated with High Levels of Soluble CR1 in Alzheimer's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 2175. doi:10.3390/ijms19082175.
- Mahmoudi, R., Kisserli, A., Novella, J.-L., Donvito, B., Dramé, M., Réveil, B., et al. (2015). Alzheimer's disease is associated with low density of the long CR1 isoform. *Neurobiol Aging*. 36, 1766.e5–12. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2015.01.006.
- McGeer, P. L., Akiyama, H., Itagaki, S., and McGeer, E. G. (1989). Activation of the classical complement pathway in brain tissue of Alzheimer patients. *Neurosci. Lett.* 107, 341–346. doi:10.1016/0304-3940(89)90843-4.
- McGeer, P. L., Rogers, J., and McGeer, E. G. (2016). Inflammation, Antiinflammatory Agents, and Alzheimer's Disease: The Last 22 Years. *J. Alzheimer's Dis.* 54, 853–857. doi:10.3233/JAD-160488.
- Morgan, B. P. (2018). Complement in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Semin. Immunopathol.* 40, 113–124. doi:10.1007/s00281-017-0662-9.
- Ogle, J. D., Noel, J. G., Sramkoski, R. M., Ogle, C. K., and Alexander, J. W. (1990). The effects of cytokines, platelet activating factor, and arachidonate metabolites on C3B receptor (CR1, CD35) expression and phagocytosis by neutrophils. *Cytokine* 2, 447–455. doi:10.1016/1043-4666(90)90054-W.
- Palmer, L. J., Damgaard, C., Holmstrup, P., and Nielsen, C. H. (2016). Influence of complement on neutrophil extracellular trap release induced by bacteria. *J. Periodontal Res.* 51, 70–76. doi:10.1111/jre.12284.

- Pascual, M., Lutz, H. U., Steiger, G., Stammner, P., and Schifferli, J. A. (1993). Release of vesicles enriched in complement receptor 1 from human erythrocytes. *J. Immunol.* 151, 397–404.
- Pietronigro, E. C., Della Bianca, V., Zenaro, E., and Constantin, G. (2017). NETosis in Alzheimer's Disease. *Front. Immunol.* 8. doi:10.3389/fimmu.2017.00211.
- Presumey, J., Bialas, A. R., and Carroll, M. C. (2017). *Complement System in Neural Synapse Elimination in Development and Disease*. 1st ed. Elsevier Inc. doi:10.1016/bs.ai.2017.06.004.
- Pruchniak, M. P., Ostafin, M., Wachowska, M., Jakubaszek, M., Kwiatkowska, B., Olesinska, M., et al. (2019). Neutrophil extracellular traps generation and degradation in patients with granulomatosis with polyangiitis and systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* 52, 126–135. doi:10.1080/08916934.2019.1631812.
- R Development Core Team, R. (2011). R: A Language and Environment for Statistical Computing. *R Found. Stat. Comput.* 1, 409. doi:10.1007/978-3-540-74686-7.
- Ricklin, D., Reis, E. S., and Lambris, J. D. (2016). Complement in disease: a defence system turning offensive. *Nat. Rev. Nephrol.* 12, 383–401. doi:10.1038/nrneph.2016.70.
- Rogers, J., Cooper, N. R., Webster, S., Schultz, J., McGeer, P. L., Styren, S. D., et al. (1992). Complement activation by β -amyloid in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 10016–10020. doi:10.1073/pnas.89.21.10016.
- Rossi, B., Constantin, G., and Zenaro, E. (2020). The emerging role of neutrophils in neurodegeneration. *Immunobiology* 225, 151865. doi:10.1016/j.imbio.2019.10.014.
- Sambandam, T., and Chatham, W. W. (1998). Ligation of CR1 attenuates Fc receptor-mediated myeloperoxidase release and HOCl production by neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 63, 477–485. doi:10.1002/jlb.63.4.477.
- Shen, Y., Lue, L. F., Yang, L. B., Roher, A., Kuo, Y. M., Strohmeier, R., et al. (2001). Complement activation by neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 305, 165–168. doi:10.1016/S0304-3940(01)01842-0.
- Stoltzner, S. E., Grenfell, T. J., Mori, C., Wisniewski, K. E., Wisniewski, T. M., Selkoe, D. J., et al. (2000). Temporal Accrual of Complement Proteins in Amyloid Plaques in Down's Syndrome with Alzheimer's Disease. *Am. J. Pathol.* 156,

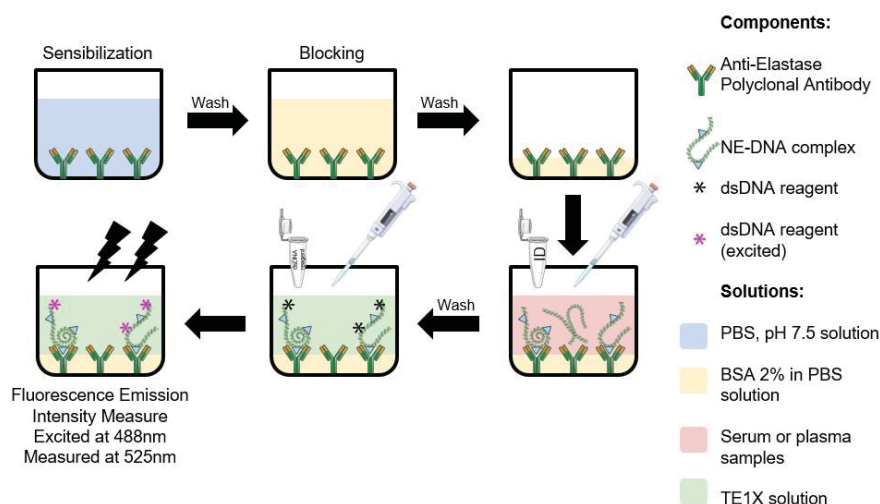
- 489–499. doi:10.1016/S0002-9440(10)64753-0.
- Tenner, A. J. (2020). Complement-Mediated Events in Alzheimer's Disease: Mechanisms and Potential Therapeutic Targets. *J. Immunol.* 204, 306–315. doi:10.4049/jimmunol.1901068.
- Tenner, A. J., Stevens, B., and Woodruff, T. M. (2018). New tricks for an ancient system: Physiological and pathological roles of complement in the CNS. *Mol. Immunol.* 102, 3–13. doi:10.1016/j.molimm.2018.06.264.
- Tetz, V., and Tetz, G. (2016). Effect of deoxyribonuclease I treatment for dementia in end-stage Alzheimer's disease: a case report. *J. Med. Case Rep.* 10, 131. doi:10.1186/s13256-016-0931-6.
- Veerhuis, R., Nielsen, H. M., and Tenner, A. J. (2011). Complement in the brain. *Mol. Immunol.* 48, 1592–1603. doi:10.1016/j.molimm.2011.04.003.
- Webster, S., Bradt, B., Rogers, J., and Cooper, N. (1997). Aggregation State-Dependent Activation of the Classical Complement Pathway by the Amyloid β Peptide. *J. Neurochem.* 69, 388–398. doi:10.1046/j.1471-4159.1997.69010388.x.
- Wyss-Coray, T., and Rogers, J. (2012). Inflammation in Alzheimer disease—A brief review of the basic science and clinical literature. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, 1–24. doi:10.1101/cshperspect.a006346.
- Yousefi, S., Mihalache, C., Kozłowski, E., Schmid, I., and Simon, H. U. (2009). Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ.* 16, 1438–1444. doi:10.1038/cdd.2009.96.
- Yuen, J., Pluthero, F. G., Douda, D. N., Riedl, M., Cherry, A., Ulanova, M., et al. (2016). NETosing neutrophils activate complement both on their own NETs and bacteria via alternative and non-alternative pathways. *Front. Immunol.* 7, 1–14. doi:10.3389/fimmu.2016.00137.
- Zenaro, E., Pietronigro, E., Bianca, V. Della, Piacentino, G., Marongiu, L., Budui, S., et al. (2015). Neutrophils promote Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline via LFA-1 integrin. *Nat. Med.* 21, 880–886. doi:10.1038/nm.3913.
- Zhu, X. C., Yu, J. T., Jiang, T., Wang, P., Cao, L., and Tan, L. (2015). CR1 in Alzheimer's Disease. *Mol. Neurobiol.* 51, 753–765. doi:10.1007/s12035-014-8723-8.

Zlokovic, B. V. (2011). Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 12, 723–738. doi:10.1038/nrn3114.

8.9 SUPPLEMENTARY MATERIAL

Using an adapted ELISA test with immunofluorescence (CZAIKOSKI et al., 2016; COLÓN et al., 2019), plasma and serum levels of NE-DNA complexes were detected (Supplementary Figure 1). The data were tested for normality (D'Agostino & Pearson test). We compared patients and controls in two ways: (1) using the absolute values (ng/mL), and (2) establishing the 3rd quartile in controls as a threshold for defining high and low NET levels (2.548 ng/mL). We also used this threshold for defining the theoretical median in the Wilcoxon test. The groups were compared using Unpaired T-test and two-way ANOVA. All the analyses were done using GraphPad Prism v.6 software. The P values were corrected for multiple testing using the false discovery rate (FDR) method (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995), performed in R language 3.6.1, through the Stats package (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011). Corrected p-values lower than 0.05 were considered significant.

SUPPLEMENTARY FIGURE 1 - IN-HOUSE ELISA TEST PERFORMED FOR QUANTIFICATION OF NETS IN SERUM AND PLASMA SAMPLES.



Bottom-transparent, 96-well plates were coated for 20 hours with anti-Elastase polyclonal antibody (Calbiochem, Cat. No. 481001). The plates were washed using detergent Tween-20 in PBS solution and blocked with bovine serum albumin (BSA) 2% in PBS solution during 2 hours at room temperature. After another washing session, the serum or plasma samples were added and incubated for 20 hours. The NE-DNA complexes are captured at their NE-end by anti-Elastase antibodies. Thus, the DNA-end of these complexes was used for detection. The plates were washed and the dsDNA reagent in TE1X solution (Component A of the Quant-iT™PicoGreen dsDNA Reagent, Invitrogen) was added to the wells. The plates were incubated for 5 minutes in a dark environment before measurement. Using a microplate-reader Synergy™ H (BioTek), the samples were excited at 488nm and fluorescence emission intensity was measured at 525nm. A DNA standard curve was prepared in 8 wells of each plate using Lambda DNA standard (Component C of the Quant-iT™PicoGreen dsDNA Reagent, Invitrogen), with DNA concentrations ranging from 1000ng/ml to 7.8125ng/ml. The reading of the fluorescence emission intensity was interpolated within the DNA standard curve.

9 CAPÍTULO 4 – EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO EM DP

FOLIC ACID AND VITAMIN B12 PREVENT DELETERIOUS EFFECTS ON MEMORY AND *KYNURENINASE* EXPRESSION IN AN ANIMAL MODEL OF PARKINSON'S DISEASE¹⁵.

Gabriela Canalli Kretzschmar^{a#}; Adriano D.S. Targa^{b#}; Sheila Coelho Soares-Lima^c; Priscila Iansen dos Santos^a; Lais Soares Rodrigues^b; Daniel Araújo Macedo^b; Luis Felipe Ribeiro Pinto^c; Marcelo M. S. Lima^{b*}; Angelica Beate Winter Boldt^{a*§}

^a Human Molecular Genetics Laboratory, Postgraduate Program in Genetics, Department of Genetics, Federal University of Paraná (UFPR), Centro Politécnico, Jardim das Américas, 81531-990, Curitiba, Paraná State, Brazil.

^b Neurophysiology Laboratory, Department of Physiology, Federal University of Paraná (UFPR), Centro Politécnico, Jardim das Américas, 81531-990, Curitiba, Paraná State, Brazil.

^c Molecular Carcinogenesis Program, National Cancer Institute, Research Coordination, Rio de Janeiro, Brazil.

Both are first authors.

* These authors contributed equally to this work

§ *Corresponding author:*

Prof. Dr. Angelica Beate Winter Boldt

Departamento de Genética

Universidade Federal do Paraná

Caixa Postal 19071

81531-980 Curitiba, Brasil

Tel: +55 (41) 3361-1553, 3361-1724

e-mail: angelicaboldt@gmail.com

¹⁵ Este artigo foi desenvolvido em colaboração com o laboratório de Neurofisiologia da UFPR. Dessa forma a primeira autoria e a supervisão são compartilhadas.

9.1 ABSTRACT

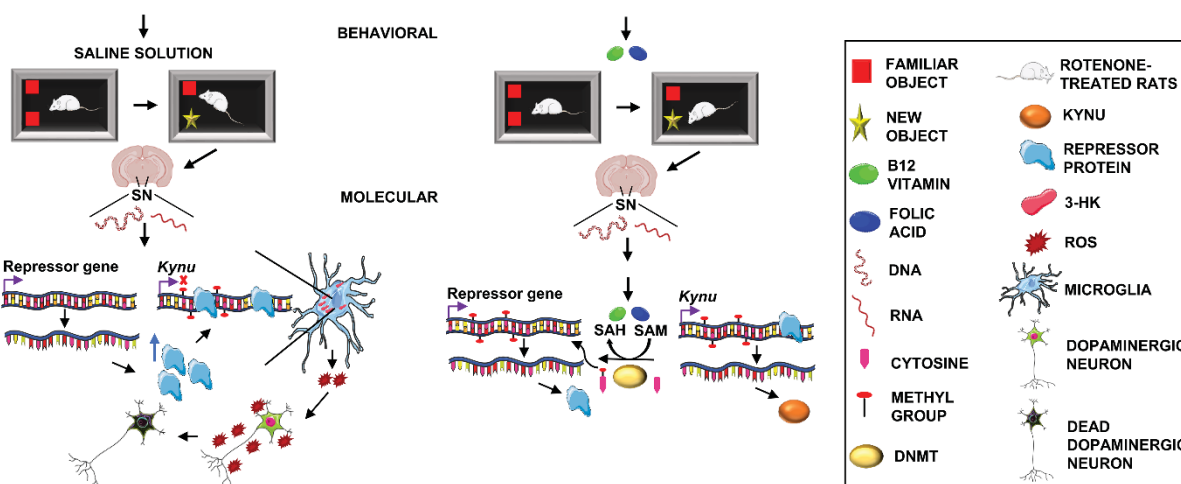
Parkinson's disease (PD) is the second most common chronic neurodegenerative disease characterized by the loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra (SN), causing less release of dopamine in the striatal tissue (St). Disorders of the tryptophan pathway can result in the accumulation of kynurenine (KYN), leading to increased levels of neurotoxic metabolites, contributing to neurodegeneration. KYN can be processed by Kynureninase (KYNU), which also processes 3-hydroxykynurenine (3-HK), both found at higher levels in PD. KYN levels are also increased in the animal model induced to PD by rotenone. Using this model, we investigated *Kynu* gene expression in response to supplementation of vitamin B12 and folic acid. These nutritional elements are fundamental for the epigenetic regulation of gene expression by DNA methylation, and there is evidence that they can lead to an improvement in memory. We evaluated memory consolidation with the Object Recognition Test (ORT) and investigated *Kynu* regulation and expression, using pyrosequencing to measure the methylation patterns of two CpG sites in *Kynu*'s promoter, and RT-qPCR. Supplementation prevented memory loss in animals induced by rotenone ($P = 0.001$). In SN of animals induced by rotenone and not supplemented, *Kynu* was down-regulated ($P = 0.0184$, fold change = -2.45). On the other hand, its expression was not changed in the supplemented group, compared to sham animals. The methylation patterns of the analyzed CpG sites were not correlated with gene expression. Therefore, supplementation possibly increased the global DNA methylation, reducing the expression of genes that inhibit *Kynu* expression. In this model, a simple intervention with folic acid and vitamin B12 supplementation prevented memory impairment inflicted by rotenone, maintaining *Kynu*'s gene expression and probably maintaining Kynu-dependent pathway homeostasis. Our study raises the possibility of supplementation with folic acid and vitamin B12 as an auxiliary therapy for PD, a hypothesis that we suggest for future research.

KEYWORDS: *Kynureninase*; Tryptophan pathway; DNA methylation; Parkinson's disease; Folate; Vitamin B12.

9.2 HIGHLIGHTS

- Folic acid and vitamin B12 prevent memory impairment in a Parkinson's disease model.
- Supplementation prevents *Kynureninase* down-regulation in the substantia nigra.
- *Kynu*'s CpG sites are differentially methylated between brain regions.
- *Kynus*'s down-regulation is not associated with methylation of these CpG sites.

9.3 GRAPHIC ABSTRACT



ABBREVIATIONS:

3-HANA - 3-hydroxyanthranilic acid; **3-HK** - 3-Hydroxykynurenine; **5hmC** - 5-hydroxymethylcytosine; **5mC** - 5-methylcytosine; **COMT** - catechol-O-methyltransferase; **DNMT** – DNA methyltransferases; **IL-6** – interleukin 6; **KATs** - kynurenine aminotransferase; **KMO** - kynurenine 3-monooxygenase; **KYN** - kynurenine; **KYNA** - kynurenic acid; **KYNU** - kynureninase; **MCP-1** - monocyte chemotactic protein 1; **SAH** - S-adenosylhomocysteine; **SAM** - S-adenosyl-L-methionine; **SN** – substantia nigra; **St**-striatum; **TFs** - transcription factors; **TNF-α** - tumor necrosis factor alpha.

9.4 INTRODUCTION

Parkinson's disease (PD) is the second most common chronic neurodegenerative disease (CORTI et al., 2011). It is characterized by intraneural α -synuclein accumulation, which contributes to the loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta (SNpc) (DUDA et al., 2002). This ultimately decreases the dopamine release in the striatal tissue (St), leading to well-known motor deficits. Several non-motor signs precede the motor symptoms, e.g. cognitive deficits, olfactory dysfunction, sleep abnormalities, cardiac sympathetic denervation, constipation, depression, and pain (OBESO et al., 2010; CORTI et al., 2011; ILKIW; LIMA, 2019; KAUR et al., 2019; ZESIEWICZ, 2019).

The disease may occur due to monogenic Mendelian inheritance of some genetic variants (early-onset familial form), but the vast majority of cases are sporadic and result from a complex interplay between genetic, epigenetic and environmental factors. Among other epigenetic factors, aging has a prominent role in the deregulation of DNA methylation, switching the methylation patterns of genes, particularly in the brain (KLEIN; JAGER, DE, 2016). However, the methylation levels of specific gene promoters is largely increased with age (RENANI et al., 2019). DNA methyltransferases (DNMTs) covalently transfer the methyl group from S-adenosyl-L-methionine (SAM) to the carbon 5 of a cytosine followed by a guanine (5'CpG3' dinucleotide), leading to the formation of 5-methylcytosine (5mC) (RENANI et al., 2019). This process can occur during DNA replication events, when DNMT1, the maintenance DNMT, copies the methylation patterns to the recently synthesized strand, or by *de novo* methylation mediated by DNMT3a and DNMT3b, which play a critical role in the brain (LARDENOIJE et al., 2015; BAYRAKTAR; KREUTZ, 2018). SAM production depends on adequate folate and complex B vitamins supply for the one-carbon cycle (MIRANDA-MORALES et al., 2017). Deregulation of this metabolic cycle results in high homocysteine levels, SAM shortage, and DNA hypomethylation. High homocysteine levels have already been reported in PD patients and have a toxic effect on dopaminergic neurons in animal models (DUAN et al., 2002; OBEID et al., 2009; GORGONE et al., 2012). Indeed, some studies have already shown that supplementation with folic acid and vitamin B12 can be beneficial for cognition improvement, and may even reduce the levels of inflammatory cytokines in human peripheral blood, showing a more effective performance when administered together

(HINTERBERGER; FISCHER, 2013; ARAÚJO et al., 2015; MCCLEERY et al., 2018; MA, F. et al., 2019).

DNA methylation influences gene expression through different mechanisms. Those best described include interference with the recognition of DNA motifs by transcription factors (TFs) and the recruitment of specific Methyl-CpG binding proteins, such as MeCP2, that further recruit co-repressor protein complexes and thereby mediate gene silencing on promoter regions (MIRANDA-MORALES et al., 2017; FREEMAN et al., 2020). Besides, 5mC demethylation can occur spontaneously or through the enzymatic action of ten-eleven translocation (TET) proteins, leading to the formation of 5-hydroxymethylcytosines (5hmC), which have a high frequency in the brain and are also considered as epigenetic marks that can lead to gene activation (HAHN et al., 2013; KLEIN; JAGER, DE, 2016). Thus, the homeostasis of this process is fundamental for health (RENANI et al., 2019). Hypomethylation of the promoter region has already been verified for some genes associated with PD, such as *SNCA*, leading to an increase in α -synuclein expression (WÜLLNER et al., 2016).

In a previous metabolome study with the rotenone rat model of PD (FAGOTTI et al., 2019), the rotenone-treated group presented high levels of kynurenine (KYN), one of the metabolites generated in the tryptophan pathway, which is frequently disturbed in neurological diseases (ZINGER et al., 2011; SCHWARCZ et al., 2012; VÉCSEI et al., 2013; MAITRE et al., 2020). One of the enzymes responsible for KYN processing is kynureninase (KYNU), encoded by the *KYNU* gene. In addition to participating in KYN processing, KYNU also processes 3-Hydroxykynurenine (3-HK), whose levels similarly rise in PD (OGAWA et al., 1992; LEWITT et al., 2013; IWAOKA et al., 2020). In this study, we used this rotenone PD model to investigate the expression of *Kynu* in response to vitamin B12 and folic acid supplementation, as these nutritional elements are critical for the epigenetic regulation of gene expression. Furthermore, there is evidence that they can lead to an improvement in memory (MA, F. et al., 2019).

9.5 MATERIAL AND METHODS

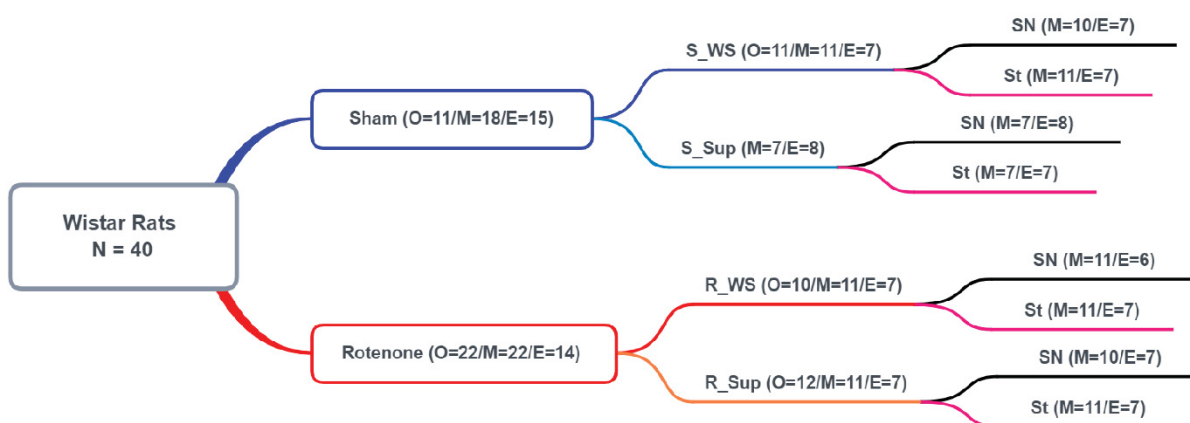
9.5.1 Subjects

This study was performed with 40 Wistar male rats, weighing approximately 280-320g. The animals were maintained in groups of 5 individuals within polypropylene cages kept in a temperature-controlled room ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) with a 12:12h light:dark cycle (lights on at 7:00 AM). Bottles of water and pellets of food were freely available throughout the entire experiment. The study was approved by the ethics committee of the Federal University of Paraná (approval ID #1289) and carried out in accordance with the Guidelines of ethics and experimental care and use of laboratory animals (SBCAL). All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used.

9.5.2 Experimental design

On day 0, the animals were submitted to stereotaxic surgery for rotenone or dimethylsulfoxide (DMSO) administration within the Substantia nigra pars compacta (SNpc). The supplementation with folic acid and vitamin B12 or saline solution started the following day and lasted for 14 days. Thus, the animals were classified into four groups: two without supplementation (WS)- rotenone (R_WS) and sham (S_WS); two with supplementation (Sup): rotenone (R_Sup) and sham (S_Sup) (Figure 1). The habituation phase of the object recognition task test (ORT) took place on days 10, 12, and 14. After the last habituation (day 14), the animals performed the training of ORT, and in the sequence (day 15), they performed the test phase of ORT. Euthanasia was performed after the test (day 15) using a guillotine. Samples from striatum and SN were collected and maintained at -80°C until processing.

FIGURA 1 - EXPERIMENTAL DESIGN



The animals were submitted to stereotaxic surgery for rotenone or dimethylsulfoxide (DMSO) administration within the Substantia nigra pars compacta. The rats were classified into four groups: two without supplementation (WS): rotenone (R_WS) and sham (S_WS); two with B12 vitamin and folic acid supplementation (Sup): rotenone (R_Sup) and sham (S_Sup). The animals were submitted for an object recognition task test (ORT). For molecular analysis, DNA and RNA were extracted from Substantia nigra (SN) and Striatum (St). It is important to note that $n = 40$ corresponds to the maximum number of animals used. The number varies according to the experiments, since for some techniques, some samples were not of sufficient quality or not at our disposal. In parentheses: number of individuals for each experiment. M = methylation pattern analysis; E = gene expression analysis; O = object recognition task.

9.5.3 Stereotaxic surgery

The animals were sedated with intraperitoneal xylazine (10 mg/kg; Syntec do Brasil Ltda, Brazil) and anesthetized with intraperitoneal ketamine (90 mg/Kg; Syntec do Brasil Ltda, Brazil). For rotenone infusion within the SNpc, we used bregma as a reference for the following coordinates: (AP) = -5.0 mm, (ML) = 2.1 mm, and (DV) = -8.0 mm (PAXINOS; WATSON, 2004). Rotenone (12 mg/ml; Sigma-Aldrich, United States) or DMSO 10% v/v (Sigma-Aldrich, United States) bilateral infusions were performed using an electronic infusion pump (Insight Instruments, Ribeirão Preto, Brazil) at a rate of 0.33 ml/minute for 3 minutes (TARGA et al., 2016).

9.5.4 Supplementation procedure

We chose folic acid and vitamin B12 as elements for supplementation, considering reports in the literature of their involvement in improving cognition, reducing levels of pro-inflammatory cytokines and relevance in the functioning of the one-carbon cycle. In addition, the administration of these two elements concomitantly appears to lead to a more effective performance (HINTERBERGER; FISCHER, 2013; ARAÚJO et al., 2015; MCCLEERY et al., 2018; MA, F. et al., 2019). The vitamins used for supplementation were obtained from a compounding pharmacy. The powdered pharmaceutical forms were diluted in saline solution (0.9%) for administration through an 8 cm orogastric needle. The animals were supplemented by gavage with either folic acid/vitamin B12 (5 and 0.5 mg/kg, respectively) or saline solution (0.9%). The supplementation was performed once a day (7:30 AM-10:30 AM) for 14 days after the surgery.

9.5.5 Object Recognition Task test (ORT)

We used the ORT to investigate the memory consolidation process. The apparatus consisted of an open box (width x length x height = 60 cm x 60 cm x 50 cm) made of wood and covered with a black opaque plastic film. The objects to be discriminated against were made of biologically neutral material such as glass, plastic, or metal. The procedure consisted of three phases: habituation, training, and the test. In the habituation phase, the animals had three minutes in days 10, 12, and 14 to explore the arena without the objects. During the training phase (15 minutes after habituation on day 14), two identical objects were exposed in the back corners of the open box, 10 cm away from the sidewall. The rat was placed in the open box facing away from the objects and after 3 minutes of exploration, the animal was removed from the open box and returned to its cage. Twenty-four hours later (test phase, 3 minutes of duration), two objects were presented in the same locations that were occupied by the previous sample objects. One of the objects was identical to the object seen in the training phase and the other one was different. Rats are animals of exploratory behavior, so it is expected that an individual who does not have memory impairment, remembers the object that had contact during the test (familiar object) and spends more time exploring the new one. The tests were video recorded for later analysis. It was considered as exploration only when the rat touched the object with its nose or when the rat's nose was directed toward an object at a distance ≤ 2 cm.

9.5.6 Methylation levels analysis

In total, 40 DNA samples (Figure 1) were extracted from frozen brain tissue of substantia nigra (SN) and striatum (St) (since these are the most affected tissues in PD), with Wizard Genomic DNA purification Kit (Promega), following the manufacturer's instructions. The DNA was treated with *EpiTect* 96 bisulfite kit (Qiagen). This treatment converts unmethylated cytosines into uracils, without altering methylated cytosines, allowing downstream quantification of methylated CpGs by other techniques, such as pyrosequencing.

We selected the *Kynu* gene, based on the report of kynurenine accumulation in the animal model of PD (FAGOTTI et al., 2019), since this is one of the genes that encodes enzymes that process kynurenine. It is also the only one with a report in the

literature of a differentially methylated site. Furthermore, it has a high sequence identity between rats and humans, besides participating in two stages of the Kynurenine pathway. We measured methylation of two CpGs in the promotor region of *Kynu* gene in the rat genome (RGSC 6.0/rn6). The second CpG is orthologous to *cg15836722* in the *KYNU* human promoter, reported by Roberson et al. (2012) as differentially methylated in skin samples of psoriasis patients. The primers were designed using the PyroMark Assay Design 2.0 (Qiagen). The primer sequences and their position in the flanking *Kynu* sequence are listed in Supplementary Table S1.

PCR was performed using a biotinylated reverse primer (Qiagen custom assay) and the PyroMark PCR kit (Qiagen) (protocol in Supplementary Table S2), followed by 1.5% agarose gel electrophoresis to check amplicon's quality and length. Pyrosequencing was performed in PyroMark Q96 (Qiagen), following the manufacturer's instructions. The percentage of DNA methylation per site was calculated using the PyroMark Q96 ID Software 2.5 (Qiagen).

9.5.7 Gene expression analysis

Total RNA was extracted from 29 samples (Figure 1) from frozen brain tissue (SN and St), with ReliaPrep miRNA Cell and Tissue Miniprep System Kit (Promega), following the manufacturer's instructions. The RNA was reverse transcribed into cDNA with the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). The *Kynu* primers were designed to be complementary to exon 13 - exon 14 junctions (Supplementary Table S3). The relative mRNA levels were normalized using the median of mRNA expression of two endogenous genes: *Beta-actin (Actb)* and *Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1 (Hprt1)*, using the sequences of the primers already described by Elfving et al., (2019). *Kynu* mRNA levels were measured by quantitative real-time using the GoTaq qPCR Master Mix (Promega) (protocol in Supplementary Table S4) in ViiA 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). All assays were conducted in triplicates and Cq values (threshold cycle) were calculated using the QuantStudio Real-Time PCR Software (Applied Biosystems). For calculating fold-change values of gene expression, we used the comparative Cq method $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

9.5.8 Statistical analysis

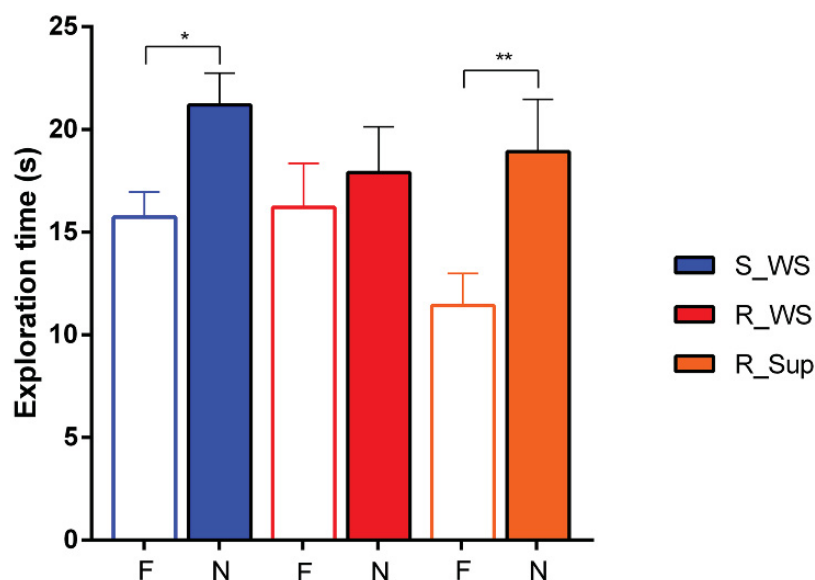
All data were tested for normality (D'Agostino & Pearson test). For analysis of methylation degree, gene expression, and memory consolidation, the groups were compared using the appropriate test for parametric and nonparametric data (Unpaired T-test and two-way ANOVA for parametric data; Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests for nonparametric data). For correlation analyses, we used Spearman's test. All the analyses were done using GraphPad Prism v.6 software (GraphPad Software, La Jolla, CA). All P values were corrected for multiple testing using the false discovery rate (FDR) method (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995), performed in R language 3.6.1, through the Stats package (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011), or for Sidak's multiple comparisons test. Corrected p-values (P(corr)) lower than 0.05 were considered significant. We used the UCSC Genome Browser (RHEAD et al., 2010), TargetScan Browser (AGARWAL et al., 2015), TarBase v.8 (KARAGKOUNI et al., 2018), miRGate (ANDRÉS-LEÓN et al., 2015), LNCipedia (v.5.2) (VOLDERS et al., 2019), and NONCODE (XIE, C. et al., 2014) to search for possible regulatory factors of the *Kynu* gene.

9.6 RESULTS

9.6.1 Object Recognition Task test (ORT)

Differently from the animals of the sham group, which spent more time exploring the new object in comparison to the familiar one (P(corr) = 0.027), rotenone administration led to an impairment in the object recognition memory (P(corr) = 0.799) (Figure 2). Supplementation with folic acid and vitamin B12 prevented the deleterious effect induced by rotenone administration over this type of memory (P(corr) = 0.001).

FIGURE 2– EXPLORATION TIME OF FAMILIAR AND NEW OBJECTS IN THE OBJECT RECOGNITION TASK (ORT).

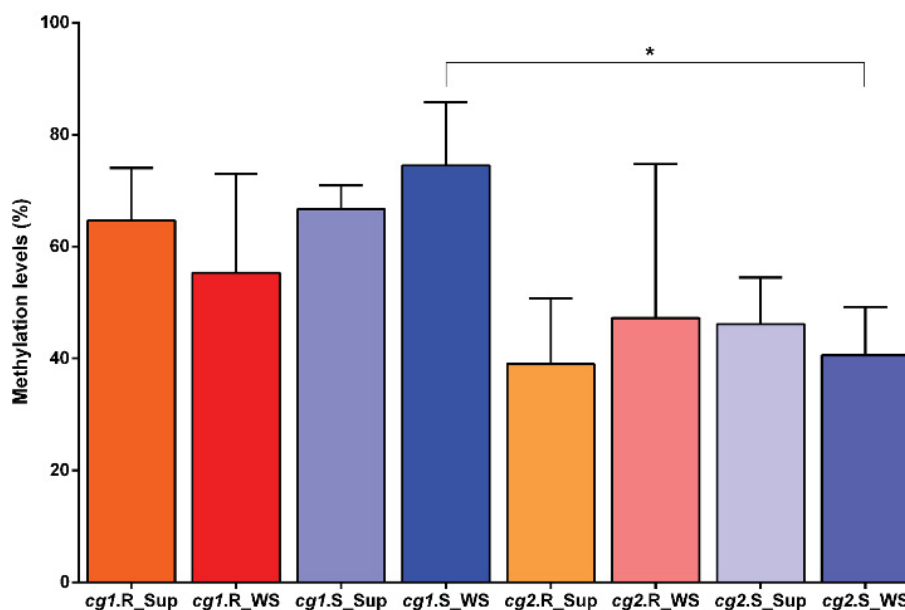


The bars plot shows the exploration time of each object – familiar (F) or new (N) – among the experimental groups. Rats are animals of exploratory behavior, so it is expected that an individual who does not have memory impairment remembers the object with which it had contact during the training phase (familiar object) and spends more time exploring the new one. Animals from sham group (S_WS) spent more time exploring the new object, as expected - * $P(\text{corr}) = 0.027$. Rotenone administration (R_WS) led to an impairment in the object recognition memory - $P(\text{corr}) = 0.799$, which was prevented in supplemented animals (R_Sup) - ** $P(\text{corr}) = 0.001$. For this experiment, the S_Sup (supplemented sham group) was not at our disposal. Nevertheless, since supplementation did not result in gene expression or methylation differences between the sham groups with and without supplementation, we believe that its absence is not severely affecting the interpretation of the outcome of this experiment.

9.6.2 DNA methylation level differences between groups

We compared the methylation levels of two CpG sites located in *Kynu* promoter region between the groups and different brain regions (SN and St). The *cg1* site showed higher methylation levels relative to the *cg2* site in the SN from the S_WS group ($P(\text{corr}) = 0.0074$) (Figure 3). No other differences were found between the groups (Supplementary Figure S5).

FIGURE 3 – METHYLATION LEVELS OF *cg1* AND *cg2* IN THE ANALYZED GROUPS IN THE SUBSTANTIA NIGRA.

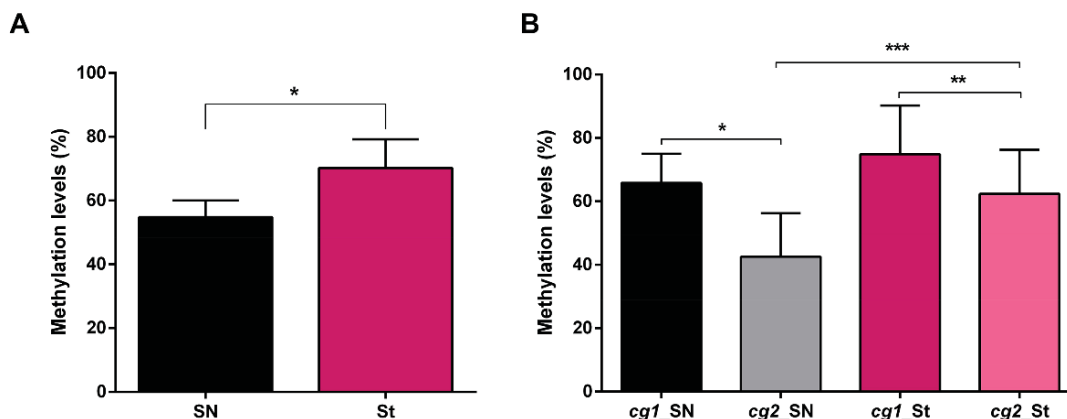


Among the analyzed groups, only sham without supplementation (S_WS) showed a difference in methylation levels between the CpG sites analyzed, with *cg1* with higher methylation levels than *cg2* - *P(corr) = 0.0074. R_Sup = Rotenone supplemented; R_WS = Rotenone without supplementation; S_Sup = Sham supplemented.

9.6.3 DNA methylation level differences between the brain regions

The CpG sites were more often methylated in the St than in the SN (P(corr) = 0.0086) (Figure 4A). In both tissues, *cg1* shows a higher methylation degree than *cg2* (SN – P(corr) = 0.0086; St – P(corr) = 0.0444). Besides that, the *cg2* site shows differences according to the brain region, being more methylated in St than in SN (*cg2* – P(corr) = 0.0139) (Figure 4B).

FIGURE 4– DIFFERENCES IN METHYLATION LEVELS BETWEEN SUBSTANTIA NIGRA AND STRIATUM



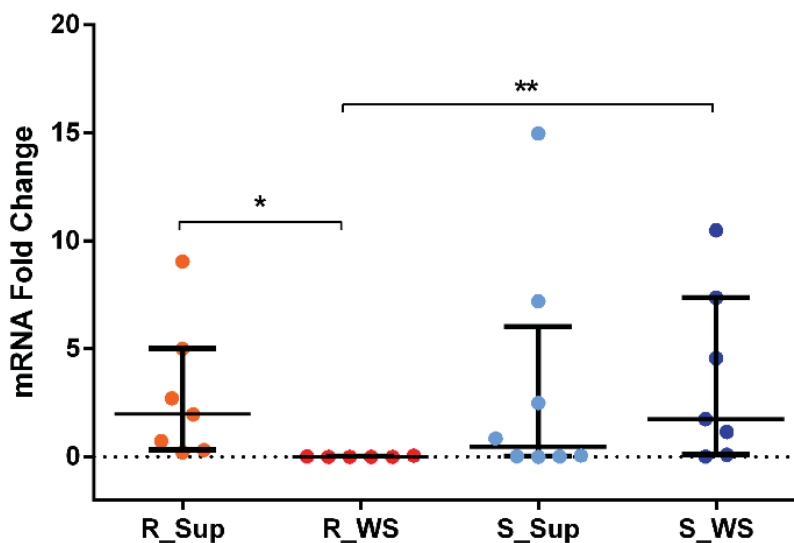
A – Methylation mean (cg1 and cg2) between substantia nigra (SN) and Striatum (St). The methylation levels are higher in St than SN *P(corr) = 0.0086. **B – Differences in methylation levels of two CpG sites analyzed between SN and St.** cg1 showed a higher methylation level than cg2 in both brain regions. *P(corr) = 0.0086; **P(corr) = 0.0444; ***P(corr) = 0.0139.

9.6.4 *Kynu* expression

We found lower *Kynu* expression in the SN of R_WS rats, compared with S_WS rats (P(corr) = 0.0184, fold change = -2.45) and R_Sup rats (P(corr) = 0.0184, fold change = -2.50) (Figure 5). R_Sup animals maintained the expression levels observed for the sham groups in the SN, meaning that the rotenone-induced decrease in *Kynu*'s gene expression was prevented in the group supplemented with vitamin B12 and folic acid.

However, the supplementation was not associated with differences in *Kynu* expression, within the St (Supplementary Figure S6) and between sham groups (SN). We did not observe expression differences between the SN and St when groups were considered together (Supplementary Figure S7). There were no correlations between *Kynu*'s expression and methylation degrees (data not shown).

FIGURE 5 – DIFFERENCES IN *Kynu* EXPRESSION BETWEEN THE GROUPS IN THE SUBSTANTIA NIGRA.



Kynu expression in rotenone-treated rats without supplementation (R_WS) is practically nonexistent when compared to the sham groups (** $P(\text{corr}) = 0.0184$, fold change = -2.45). Those rotenone-treated rats which received the supplementation with folic acid and B12 vitamin (R_Sup) maintained the expression levels observed for the sham groups supplemented (S_Sup) and without supplementation (S_WS), meaning that the rotenone-induced decrease in *Kynu*'s gene expression was prevented in the supplemented group (R_Sup) (* $P(\text{corr}) = 0.0184$, fold change = -2.50)..

9.7 DISCUSSION

Disturbances in the one-carbon cycle, leading to changes in SAM production and consequently in methylation patterns, have already been associated with PD and linked to a cognitive decline (OBEID et al., 2009). PD patients with cognitive deficits have high levels of homocysteine (hyperhomocysteinemia), and reduced levels of folate and vitamin B12 (XIE et al., 2017; CHRISTINE et al., 2018, 2020), especially those treated with levodopa (L-DOPA), a dopamine precursor more suitable for treatment, but which over the years leads to adverse side effects such as dyskinesia (BASTIDE et al., 2015). The metabolism of plasma levodopa involves methylation reactions, catalyzed by catechol-O-methyltransferase (COMT), which uses SAM as methyl donor, resulting in S-adenosylhomocysteine (SAH) and consequent homocysteine formation (MULLER, 2003; QURESHI et al., 2008; MURRAY; JADAVJI, 2019). The accumulation of homocysteine is toxic to dopaminergic neurons, contributing to neurodegeneration (KRUMAN et al., 2000; DUAN et al., 2002), which can be avoided by the promotion of SAH recycling within the one-carbon cycle. For this, the presence of vitamin B12 and folate is essential, as they will act as cofactors

for the remethylation of homocysteine in methionine, which can be used for SAM production (MURRAY; JADAVJI, 2019). Thus, a possible strategy to counteract homocysteine accumulation is by supplementing the diet with essential elements for the optimal functioning of this cycle, like vitamin B12 and folic acid (XU et al., 2012; LARDENOIJE et al., 2015; MCCARTER et al., 2019, 2020).

Rotenone administration impaired memory consolidation in the ORT, as previously demonstrated (TARGA et al., 2018; FAGOTTI et al., 2019). Interestingly, folic acid and vitamin B12 supplementation not only prevented the decrease in *Kynu* expression induced by this neurotoxin but also hindered its deleterious effect in recognition memory. Our results are in line with a study that analyzed the effect of supplementation with folic acid and vitamin B12 on memory and levels of inflammatory factors in 240 patients with mild cognitive impairment (MCI) (MA, F. et al., 2019). They found an overall improvement in cognitive function, reduced levels of homocysteine, interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), and monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), with better results when folic acid and vitamin B12 were administered together. The KYN pathway can be activated by inflammatory factors, such as TNF- α and IL-6, which lead to the expression of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO-1), inducing the catalysis of tryptophan through this route (MOFFETT; NAMBOODIRI, 2003; MÁNDI; VÉCSEI, 2012; VÉCSEI et al., 2013). Besides, other enzymes involved in the pathway, such as KMO, can also be stimulated by inflammatory mediators leading to a high concentration of neurotoxic metabolites (FUJIGAKI et al., 2017). A reduction in the levels of these inflammatory factors by supplementation could reduce the production of neurotoxic metabolites, leading to an improvement in memory.

In our study, supplementation with folic acid and vitamin B12 was clearly associated with differences in *Kynu* expression. Gene transcription was silenced in animals from the rotenone group that was not supplemented (R_WS), while those receiving vitamin B12 and folic acid (R_Sup) showed similar levels compared to the sham group. Supplementation made no difference in the sham groups, an indication that an extra supply of vitamin B12 and folic acid does not alter *Kynu* expression in baseline (healthy) conditions. Also, no changes in gene expression were observed in the dorsal striatum, which may be related to the fact that this region is the terminal portion of the nigrostriatal pathway, where the regulatory impact of treatments probably manifests later (MS LIMA et al., 2012).

Although supplementation led to changes in gene expression, it did not affect the methylation levels of the analyzed CpG sites in *Kynu* promoter. However, there is clear differential methylation of these sites, depending on the brain region, with *Kynu* presenting higher methylation levels in the striatum than in the substantia nigra. The differences in methylation status among brain regions observed in our study corroborate previous results (KLEIN; JAGER, DE, 2016).

Kynu can be considered a low CpG promoter (LCP) gene since there are no CpG islands in its promoter region, but only sparse CpG dinucleotides, indicating that the regulation of this gene may involve other mechanisms besides methylation, such as regulatory proteins (HARTUNG et al., 2012). *Kynu*'s promoter harbors binding motifs for different transcription repressor proteins - CCAAT enhancer binding protein beta (CEBPB), FOS, GATA3, JUN, JUND, MYC, RUNX3 (UCSC). These proteins are encoded by genes with extensive CpG islands in their promoter regions and/or along the gene. Thus, in contrast to *Kynu*, these genes are more likely to be regulated by their CpG methylation levels. Although supplementation did not alter *Kynu*'s methylation at two representative CpG sites, it possibly altered the methylation of repressor protein genes, silencing their expression and consequently, liberating *Kynu*'s promoter region for transcription. A similar scenario may be true for the expression of repressor noncoding RNAs (ncRNAs), as microRNAs (miRNA), controlling the translation of *Kynu*'s mRNA in the cytoplasm. As an example, miR-142 down-regulation has already been correlated with *KYNU* upregulation in humans (LIU et al., 2019). Nevertheless, the genes encoding miRNAs that potentially regulate *Kynu* expression in rats do not present CpG islands (UCSC), and miR-142 rat homolog does not regulate the *Kynu* gene (TargetScan). At the same time, the information available in the literature and the databases of long non-coding RNAs (lncRNAs) in rats is scarce. There is still no evidence that lncRNAs might regulate *Kynu* in any of the consulted databases.

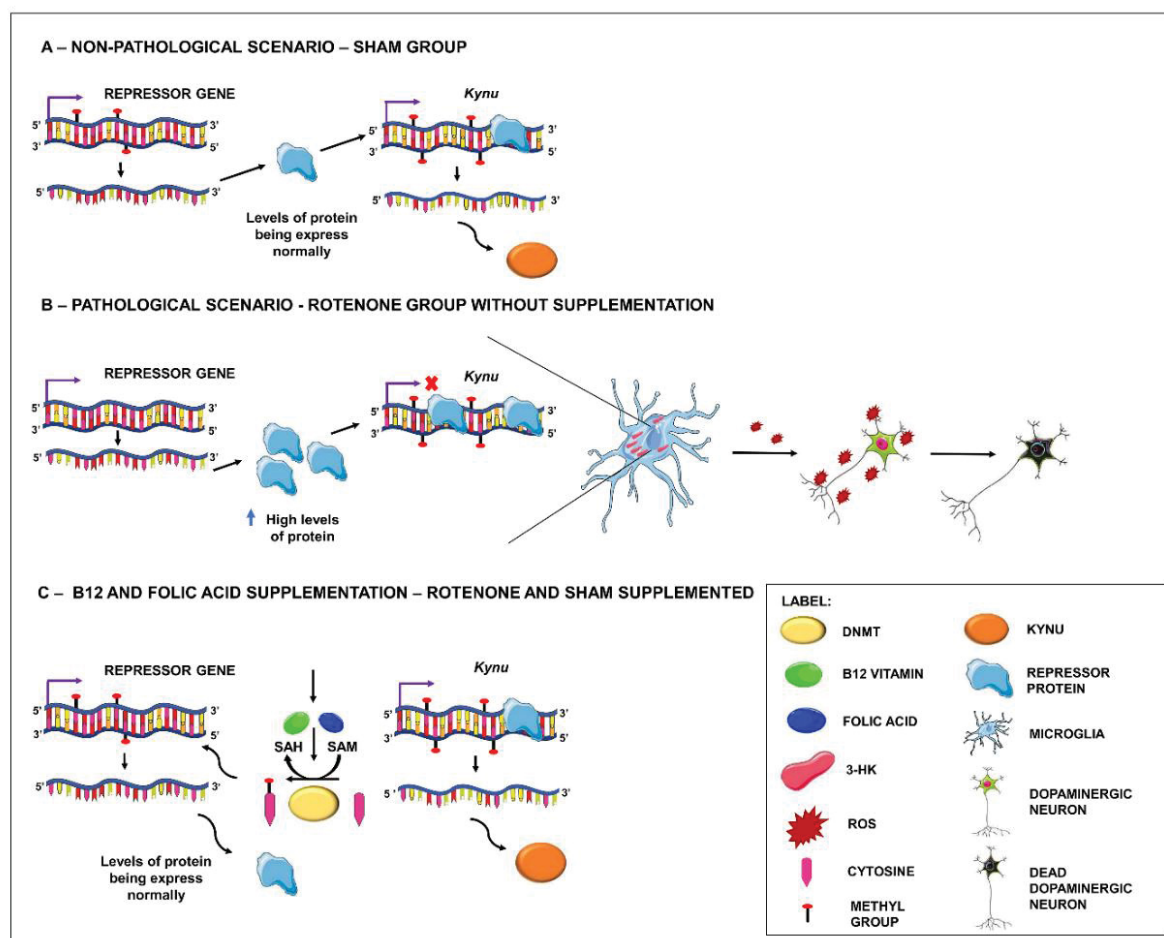
Based on this, we propose that in a non-pathological scenario, *Kynu* is possibly expressed at baseline levels, as well as the putative repressor protein/ncRNA, which is not expressed in sufficient levels to completely suppress *Kynu* expression (Figure 6A). However, in the specific context of the rotenone-induced PD model, this repressor may have its promoter region hypomethylated, leading to a continuous expression and increasing the protein/ncRNA levels, resulting in intense *Kynu* repression (Figure 6B). With folic acid and B12 supplementation, the repressor's promoter region returns to its

baseline methylation state or becomes completely methylated, reducing or silencing the expression of that repressor and allowing *Kynu*'s expression (Figure 6C).

The accumulation of KYN after nigrostriatal rotenone-induced lesion was originally reported by Fagotti et al. (2019) through a metabolome analysis indicating that KYN is a notable early-phase biomarker of PD since inflammation induces enzymes in the kynurenine pathway (FUJIGAKI et al., 2017).

KYN can be processed by up to three different enzymes, resulting in different metabolites: branch of kynurenine aminotransferase (KATs), forming kynurenic acid (KYNA); the branch of Kynureninase (KYNU) leading to the formation of Anthranilic acid, that could serve as a precursor to the formation of 3-hydroxy anthranilic acid (3-HANA); the branch of kynurenine 3-monooxygenase (KMO), resulting in 3-hydroxykynurenine (3-HK), which is processed by KYNU and will result in 3-HANA, or can be metabolized by KATs in Xanthurenic acid (Figure 7). KYN tends to be preferentially processed by KMO since this enzyme has a high affinity for KYN (BENDER; MCCREANOR, 1982; FUJIGAKI et al., 2017). 3-HK, a neuroactive metabolite resulting from KYN processing by KMO, has already been observed at high levels in the frontal cortex, putamen, substantia nigra (OGAWA et al., 1992) and cerebrospinal fluid (CSF) (IWAOKA et al., 2020) of PD patients. As this metabolite can be processed by KYNU, low levels of this enzyme may trigger the accumulation of 3-HK, resulting in a toxic effect due to free radicals, superoxide, and hydrogen peroxide, which leads to oxidative damage, neuronal apoptosis, and consequently to neurodegeneration (OKUDA et al., 1998; FUJIGAKI et al., 2017; LIM et al., 2017). Oxidative stress is known to play one of the leading roles in PD-induced neurodegeneration (reviewed in Jiang et al., 2016). Therefore, ways to avoid or reduce this process should be urgently evaluated.

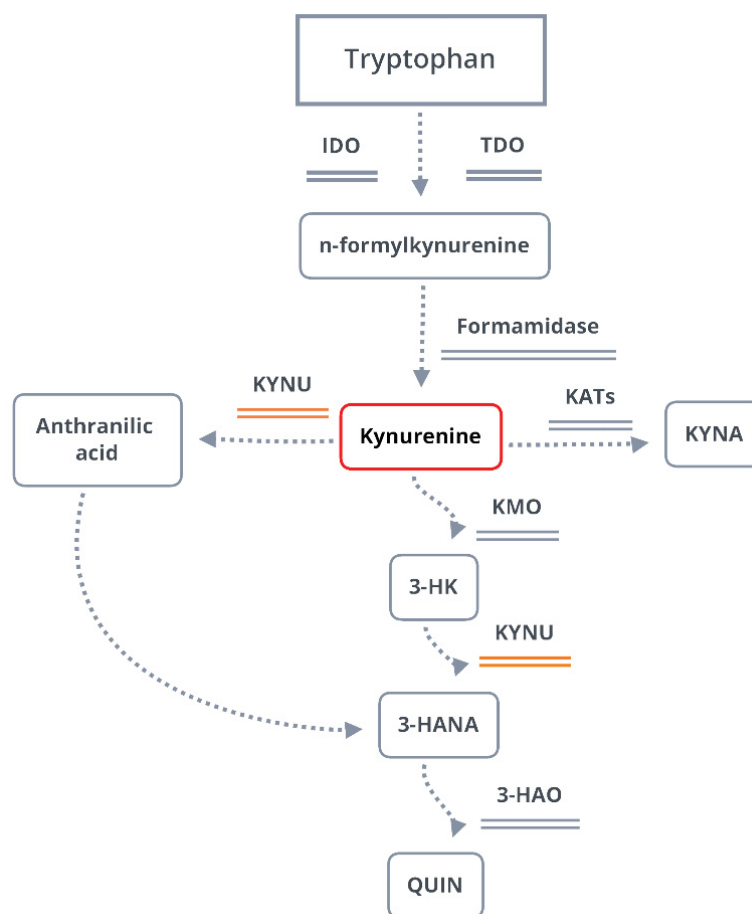
FIGURE 6. EFFECTS OF SUPPLEMENTATION WITH FOLIC ACID AND VITAMIN B12 ON KYNURENINASE EXPRESSION.



A - In a non-pathological scenario, *Kynu* is possibly expressed at normal levels, as well as the repressor protein, which does not have sufficient levels to completely suppress *Kynu* expression. **B**- In a pathological scenario, this repressor may have its hypomethylated promoter region, leading to a continuous expression and, increasing the protein levels, resulting in intense *Kynu* repression. 3-hydroxykynurenine (3-HK) can be processed by KYNU and low levels of this enzyme may trigger the accumulation of 3-HK, resulting in a toxic effect due to generation of free radicals, superoxide, and hydrogen peroxide, which leads to cell death. **C**- With folic acid and B12 supplementation, the DNA methylation process is normalized and the repressor's promoter region returns to its standard methylation state or becomes completely methylated, reducing or silencing the expression of that repressor and allowing for *Kynu* expression to occur and 3-HK to be processed properly.

The influence of the Kynurenine pathway in PD becomes increasingly evident. Deregulations in its mechanism, such as the scarcity of fundamental enzymes, can lead to the accumulation of neurotoxic metabolites, resulting in a process of neurodegeneration. Considering the results obtained in our study, with the supplementation of folic acid and vitamin B12, it is possible to consider that a simple intervention with these elements may contribute to counteract the neurodegenerative process, possibly improving the symptoms of the disease.

FIGURE 7 – TRYPTOPHAN PATHWAY WITH AN EMPHASIS ON THE KYNURENINE PATHWAY (KP) AND KYNURENINASE (KYNU) PARTICIPATION.



The KP accounts for catabolizing 95% of the tryptophan available in the body. In the brain, tryptophan is catabolized in formylkynurenine by the action of indoleamine 3-dioxygenase (IDO) and later in Kynurenine (KYN) by formamidase. KYN can be processed by three different enzymes, leading to different routes. If processed by Kynureninase (KYNU), the formation of anthranilic acid will occur, which can later serve as a precursor for the formation of 3-hydroxyanthranilic acid (3-HANA). If KYN is catabolized by Kynurenine aminotransferases (KATs), there will be the formation of Kynurenic acid (KYNA). Finally, KYN can be processed by Kynurenine 3-monoxygenase (KMO), resulting in 3-hydroxykynurenine (3-HK), which can be metabolized by KYNU, giving rise to 3-HANA. 3-HAO – 3-hydroxyanthranilic acid 3,4- dioxygenase; QUIN – acid quinolinic; TDO – tryptophan 2,3-dioxygenase.

This research has some limitations. We did not quantify 5hmC, which is an intermediate in the demethylation process. Besides, only two CpG sites were considered in our *Kynu* methylation analysis. We did not assess KYNU protein, 3-HK metabolite, and homocysteine levels in this study. The levels of gene expression and methylation status of possible *Kynu* repressors have not been evaluated. However, our promising results from a validated animal model of Parkinson's disease may encourage studies with others PD models, and in future with humans, in order to confirm our findings.

9.8 CONCLUSION

In our study, we found that a simple intervention with folic acid and vitamin B12 administration provides clear beneficial effects at molecular and behavioral levels to the rotenone model of PD. It not only improved the animals' recognition memory but also maintained the synthesis of *Kynureninase* mRNA, without changing the methylation status of two critical CpG dinucleotides in *Kynu* promoter region. This may be related to the restoration of methylation patterns in the promoter region of repressor protein/ncRNA genes with a fundamental role in the regulation of *Kynu*. Our study brings the exciting possibility that patients with Parkinson's disease may benefit from vitamin B12 and folic acid supplementation, a hypothesis which we suggest as subject for future investigations.

9.9 ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PROAP – Finance Code 001) for financial support and the scholarships provided to GCK; Ph.D. Maria Luiza Petzel-Erler for providing the laboratory structure where part of the work was performed; Monique de Souza Almeida Lopes for performing pyrosequencing; Leonardo A. S. Kretzschmar for assistance with formatting the images.

AVAILABILITY OF DATA AND MATERIALS: All the data are available from the corresponding author on request.

AUTHOR CONTRIBUTIONS: Conceptualization: A.B.W.B., M.M.S.L., G.C.K., and A.D.S.T.; Methodology: G.C.K., A.D.S.T.; P.I.S., L.S.R., D.A.M., and S.C.S.L.; Statistics Analysis: G.C.K. and A.D.S.T.; Resources: A.B.W.B., M.M.S.L., S.C.S.L., and L.F.R.P.; Writing – Original Draft: G.C.K. and A.D.S.T.; Supervision: A.B.W.B., and M.M.S.L.; Funding Acquisition: A.B.W.B., and M.M.S.L. All authors read and approved the final manuscript.

COMPETING INTERESTS: The authors declare no competing interests.

FUNDING: This work was supported by grants of Fundação Araucária (FA-protocol 39894.413.43926.1904/2013 and 116/2018, protocol 50.530), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior–Brasil (CAPES-40001016006P1) (G.C.K. grant), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (A.B.W.B. and M.M.S.L. are recipients of CNPq fellowships CNPq-314288/2018-0 and CNPq-308718/2019-4, respectively). The funding agencies had no role in study design, in the collection, analysis, and interpretation of data, in the writing of the letter and in the decision to submit it for publication.

9.10 REFERENCES

- Agarwal, V., Bell, G.W., Nam, J.-W., Bartel, D.P., 2015. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife* 4, 1–38. <https://doi.org/10.7554/eLife.05005>
- Andrés-León, E., González Peña, D., Gómez-López, G., Pisano, D.G., 2015. miRGate: a curated database of human, mouse and rat miRNA–mRNA targets. *Database* 2015, 1–9. <https://doi.org/10.1093/database/bav035>
- Araújo, J.R., Martel, F., Borges, N., Araújo, J.M., Keating, E., 2015. Folates and aging: Role in mild cognitive impairment, dementia and depression. *Ageing Res. Rev.* 22, 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2015.04.005>
- Bastide, M.F., Meissner, W.G., Picconi, B., Fasano, S., Fernagut, P.-O., Feyder, M., Francardo, V., Alcacer, C., Ding, Y., Brambilla, R., Fisone, G., Jon Stoessl, A., Bourdenx, M., Engeln, M., Navailles, S., De Deurwaerdère, P., Ko, W.K.D., Simola, N., Morelli, M., Groc, L., Rodriguez, M.-C., Gurevich, E. V., Quik, M., Morari, M., Mellone, M., Gardoni, F., Tronci, E., Guehl, D., Tison, F., Crossman, A.R., Kang, U.J., Steece-Collier, K., Fox, S., Carta, M., Angela Cenci, M., Bézard, E., 2015. Pathophysiology of L-dopa-induced motor and non-motor complications in Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* 132, 96–168. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.07.002>
- Bayraktar, G., Kreutz, M.R., 2018. Neuronal DNA Methyltransferases: Epigenetic Mediators between Synaptic Activity and Gene Expression? *Neurosci.* 24, 171–185. <https://doi.org/10.1177/1073858417707457>
- Bender, D.A., McCreanor, G.M., 1982. The preferred route of kynurenine metabolism in the rat. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 717, 56–60. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(82\)90379-8](https://doi.org/10.1016/0304-4165(82)90379-8)
- Benjamini, Y., Hochberg, Y., 1995. Controlling the False Discovery Rate : A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J.R. Stat. Soc. B* 57, 289–300.
- Christine, C.W., Auinger, P., Joslin, A., Yelapaala, Y., Green, R., 2018. Vitamin B12 and Homocysteine Levels Predict Different Outcomes in Early Parkinson's Disease. *Mov. Disord.* 33, 762–770. <https://doi.org/10.1002/mds.27301>
- Christine, C.W., Auinger, P., Saleh, N., Tian, M., Bottiglieri, T., Arning, E., Tran, N.K., Ueland, P.M., Green, R., 2020. Relationship of Cerebrospinal Fluid Vitamin B12 Status Markers With Parkinson's Disease Progression. *Mov. Disord.* mds.28073.

<https://doi.org/10.1002/mds.28073>

- Corti, O., Lesage, S., Brice, A., 2011. What Genetics Tells us About the Causes and Mechanisms of Parkinson's Disease. *Physiol. Rev.* 91, 1161–1218.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00022.2010>
- Duan, W., Ladenheim, B., Cutler, R.G., Kruman, I.I., Cadet, J.L., Mattson, M.P., 2002. Dietary folate deficiency and elevated homocysteine levels endanger dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. *J. Neurochem.*
<https://doi.org/10.1046/j.0022-3042.2001.00676.x>
- Duda, J.E., Giasson, B.I., Mabon, M.E., Lee, V.M.Y., Trojanowski, J.Q., 2002. Novel antibodies to synuclein show abundant striatal pathology in Lewy body diseases. *Ann. Neurol.* 52, 205–210. <https://doi.org/10.1002/ana.10279>
- Elfving, B., Müller, H.K., Oliveras, I., Østerbøg, T.B., Rio-Alamos, C., Sanchez-Gonzalez, A., Tobeña, A., Fernandez-Teruel, A., Aznar, S., 2019. Differential expression of synaptic markers regulated during neurodevelopment in a rat model of schizophrenia-like behavior. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* 95, 109669.
<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2019.109669>
- Fagotti, J., Targa, A.D.S., Rodrigues, L.S., Nosedá, A.C.D., Dorieux, F.W.C., Scarante, F.F., Ilkiw, J.L., Louzada, F.M., Chowdhury, N.R., van der Veen, D.R., Middleton, B., Pennings, J.L.A., Swann, J.R., Skene, D.J., Lima, M.M.S., 2019. Chronic sleep restriction in the rotenone Parkinson's disease model in rats reveals peripheral early-phase biomarkers. *Sci. Rep.* <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37657-6>
- Freeman, D.M., Lou, D., Li, Y., Martos, S.N., Wang, Z., 2020. The conserved DNMT1-dependent methylation regions in human cells are vulnerable to neurotoxicant rotenone exposure. *Epigenetics and Chromatin* 13, 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13072-020-00338-8>
- Fujigaki, H., Yamamoto, Y., Saito, K., 2017. L-Tryptophan-kynurenine pathway enzymes are therapeutic target for neuropsychiatric diseases: Focus on cell type differences. *Neuropharmacology* 112, 264–274. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.01.011>
- Gorgone, G., Currò, M., Ferlazzo, N., Parisi, G., Parnetti, L., Belcastro, V., Tambasco, N., Rossi, A., Pisani, F., Calabresi, P., Ientile, R., Caccamo, D., 2012. Coenzyme Q10, Hyperhomocysteinemia and MTHFR C677T Polymorphism in Levodopa-treated Parkinson's Disease Patients. *NeuroMolecular Med.* 14, 84–90.

<https://doi.org/10.1007/s12017-012-8174-1>

Hahn, M.A., Qiu, R., Wu, X., Li, A.X., Zhang, H., Wang, J., Jui, J., Jin, S.G., Jiang, Y., Pfeifer, G.P., Lu, Q., 2013. Dynamics of 5-Hydroxymethylcytosine and Chromatin Marks in Mammalian Neurogenesis. *Cell Rep.* 3, 291–300.

<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.01.011>

Hartung, T., Zhang, L., Khrebtukova, I., Reinhardt, M., Wang, C., Therneau, T.M., Banck, M.S., Schroth, G.P., Beutler, and A.S., 2012. Diametrically opposite methylome-transcriptome relationships in high- and low-CpG promoter genes in postmitotic neural rat tissue. *Epigenetics* 7, 421–428. <https://doi.org/10.4161/epi.19565>

Hinterberger, M., Fischer, P., 2013. Folate and Alzheimer: when time matters. *J. Neural Transm.* 120, 211–224. <https://doi.org/10.1007/s00702-012-0822-y>

Ilkiw, J., Lima, M.S., 2019. Perspectives for the association between olfactory disturbances and depression in Parkinson's disease. *Neural Regen. Res.* 14, 591.

<https://doi.org/10.4103/1673-5374.247461>

Iwaoka, K., Otsuka, C., Maeda, T., Yamahara, K., Kato, K., Takahashi, Kenta, Takahashi, Kai, Terayama, Y., 2020. Impaired metabolism of kynurenine and its metabolites in CSF of parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 714, 134576.

<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.134576>

Jiang, T., Sun, Q., Chen, S., 2016. Oxidative stress: A major pathogenesis and potential therapeutic target of antioxidative agents in Parkinson's disease and Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.* 147, 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2016.07.005>

Karagkouni, D., Paraskevopoulou, M.D., Chatzopoulos, S., Vlachos, I.S., Tastsoglou, S., Kanellos, I., Papadimitriou, D., Kavakiotis, I., Maniou, S., Skoufos, G., Vergoulis, T., Dalamagas, T., Hatzigeorgiou, A.G., 2018. DIANA-TarBase v8: a decade-long collection of experimentally supported miRNA–gene interactions. *Nucleic Acids Res.* 46, D239–D245. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1141>

Kaur, R., Mehan, S., Singh, S., 2019. Understanding multifactorial architecture of Parkinson's disease: pathophysiology to management. *Neurol. Sci.* 40, 13–23.

<https://doi.org/10.1007/s10072-018-3585-x>

Klein, H., De Jager, P.L., 2016. Uncovering the Role of the Methylome in Dementia and Neurodegeneration. *Trends Mol. Med.* 22, 687–700.

<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.06.008>

- Kruman, I.I., Culmsee, C., Chan, S.L., Kruman, Y., Guo, Z., Penix, L.R., Mattson, M.P., 2000. Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity. *J. Neurosci.* 20, 6920–6926. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-18-06920.2000>
- Lardenoije, R., Iatrou, A., Kenis, G., Kompotis, K., Steinbusch, H.W.M., Mastroeni, D., Coleman, P., Lemere, C.A., Hof, P.R., van den Hove, D.L.A., Rutten, B.P.F., 2015. The epigenetics of aging and neurodegeneration. *Prog. Neurobiol.* 131, 21–64. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.05.002>
- LeWitt, P.A., Li, J., Lu, M., Beach, T.G., Adler, C.H., Guo, L., 2013. 3-hydroxykynurenine and other Parkinson's disease biomarkers discovered by metabolomic analysis. *Mov. Disord.* 28, 1653–1660. <https://doi.org/10.1002/mds.25555>
- Lim, C.K., Fernández-Gomez, F.J., Braidy, N., Estrada, C., Costa, C., Costa, S., Bessedé, A., Fernández-Villalba, E., Zinger, A., Herrero, M.T., Guillemin, G.J., 2017. Involvement of the kynurenine pathway in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* 155, 76–95. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.12.009>
- Liu, X., Chen, J., Guan, T., Yao, H., Zhang, W., Guan, Z., Wang, Y., 2019. MiRNAs and target genes in the blood as biomarkers for the early diagnosis of Parkinson's disease. *BMC Syst. Biol.* 13. <https://doi.org/10.1186/s12918-019-0680-4>
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25, 402–8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Ma, F., Zhou, X., Li, Q., Zhao, J., Song, A., An, P., Du, Y., Xu, W., Huang, G., 2019. Effects of Folic Acid and Vitamin B12, Alone and in Combination on Cognitive Function and Inflammatory Factors in the Elderly with Mild Cognitive Impairment: A Single-blind Experimental Design. *Curr. Alzheimer Res.* 16, 622–632. <https://doi.org/10.2174/1567205016666190725144629>
- Maitre, M., Klein, C., Patte-Mensah, C., Mensah-Nyagan, A.-G., 2020. Tryptophan metabolites modify brain A β peptide degradation: A role in Alzheimer's disease? *Prog. Neurobiol.* 190, 101800. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2020.101800>
- Mándi, Y., Vécsei, L., 2012. The kynurenine system and immunoregulation. *J. Neural*

Transm. 119, 197–209. <https://doi.org/10.1007/s00702-011-0681-y>

McCarter, S.J., Stang, C., Turcano, P., Mielke, M.M., Ali, F., Bower, J.H., Savica, R., 2020. Higher vitamin B12 level at Parkinson's disease diagnosis is associated with lower risk of future dementia. *Park. Relat. Disord.* 73, 19–22.

<https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2020.03.009>

McCarter, S.J., Teigen, L.M., McCarter, A.R., Benarroch, E.E., St. Louis, E.K., Savica, R., 2019. Low Vitamin B12 and Parkinson Disease. *Mayo Clin. Proc.* 94, 757–762.

<https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2019.01.039>

McCleery, J., Abraham, R.P., Denton, D.A., Rutjes, A.W., Chong, L.-Y., Al-Assaf, A.S., Griffith, D.J., Rafeeq, S., Yaman, H., Malik, M.A., Di Nisio, M., Martínez, G., Vernooij, R.W., Tabet, N., 2018. Vitamin and mineral supplementation for preventing dementia or delaying cognitive decline in people with mild cognitive impairment. *Cochrane Database Syst. Rev.* 63, 713. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011905.pub2>

Miranda-Morales, E., Meier, K., Sandoval-Carrillo, A., Salas-Pacheco, J., Vázquez-Cárdenas, P., Arias-Carrión, O., 2017. Implications of DNA Methylation in Parkinson's Disease. *Front. Mol. Neurosci.* <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00225>

Moffett, J.R., Namboodiri, M.A., 2003. Tryptophan and the immune response. *Immunol. Cell Biol.* 81, 247–265. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1711.2003.t01-1-01177.x>

MS Lima, M., L Andersen, M., B Reksidler, A., C Ferraz, A., ABF Vital, M., Tufik, S., 2012. Paradoxical sleep deprivation modulates tyrosine hydroxylase expression in the nigrostriatal pathway and attenuates motor deficits induced by dopaminergic depletion. *CNS Neurol. Disord. Targets (Formerly Curr. Drug Targets-CNS Neurol. Disord.)* 11, 359–368.

Muller, T., 2003. Benefit of folic acid supplementation in parkinsonian patients treated with levodopa. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 74, 549–549.

<https://doi.org/10.1136/jnnp.74.4.549>

Murray, L.K., Jadavji, N.M., 2019. The role of one-carbon metabolism and homocysteine in Parkinson's disease onset, pathology and mechanisms. *Nutr. Res. Rev.* 32, 218–230.

<https://doi.org/10.1017/S0954422419000106>

Obeid, R., Schadt, A., Dillmann, U., Kostopoulos, P., Fassbender, K., Herrmann, W., 2009. Methylation status and neurodegenerative markers in Parkinson disease. *Clin. Chem.*

55, 1852–1860. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2009.125021>

- Obeso, J. a, Rodriguez-Oroz, M.C., Goetz, C.G., Marin, C., Kordower, J.H., Rodriguez, M., Hirsch, E.C., Farrer, M., Schapira, A.H. V, Halliday, G., 2010. Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. *Nat. Med.* 16, 653–661. <https://doi.org/10.1038/nm.2165>
- Ogawa, T., Matson, W.R., Beal, M.F., Myers, R.H., Bird, E.D., Milbury, P., Saso, S., 1992. Kynurenine pathway abnormalities in Parkinson's disease. *Neurology* 42, 1702.
- Okuda, S., Nishiyama, N., Saito, H., Katsuki, H., 1998. 3-Hydroxykynurenine, an Endogenous Oxidative Stress Generator, Causes Neuronal Cell Death with Apoptotic Features and Region Selectivity. *J. Neurochem.* 70, 299–307. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1998.70010299.x>
- Paxinos, G., Watson, C., 2004. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates - The New Coronal Set 209. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Qureshi, G., Qureshi, A., Devrajani, B., Chippa, M., Syed, S., 2008. Is the Deficiency of Vitamin B12 Related to Oxidative Stress and Neurotoxicity in Parkinsons Patients? *CNS Neurol. Disord. - Drug Targets* 7, 20–27. <https://doi.org/10.2174/187152708783885101>
- R Development Core Team, R., 2011. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Found. Stat. Comput., R Foundation for Statistical Computing. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-74686-7>
- Renani, P.G., Taheri, F., Rostami, D., Farahani, N., Abdolkarimi, H., Abdollahi, E., Taghizadeh, E., Gheibi Hayat, S.M., 2019. Involvement of aberrant regulation of epigenetic mechanisms in the pathogenesis of Parkinson's disease and epigenetic-based therapies. *J. Cell. Physiol.* 234, 19307–19319. <https://doi.org/10.1002/jcp.28622>
- Rhead, B., Karolchik, D., Kuhn, R.M., Hinrichs, A.S., Zweig, A.S., Fujita, P.A., Diekhans, M., Smith, K.E., Rosenbloom, K.R., Raney, B.J., Pohl, A., Pheasant, M., Meyer, L.R., Learned, K., Hsu, F., Hillman-Jackson, J., Harte, R.A., Giardine, B., Dreszer, T.R., Clawson, H., Barber, G.P., Haussler, D., Kent, W.J., 2010. The UCSC Genome Browser database: update 2010. *Nucleic Acids Res.* 38, D613–D619. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp939>
- Roberson, E.D.O., Liu, Y., Ryan, C., Joyce, C.E., Duan, S., Cao, L., Martin, A., Liao, W., Menter, A., Bowcock, A.M., 2012. A Subset of Methylated CpG Sites Differentiate

Psoriatic from Normal Skin - Suppl. *J. Invest. Dermatol.* 132, 583–592.

<https://doi.org/10.1038/jid.2011.348>

Schwarcz, R., Bruno, J.P., Muchowski, P.J., Wu, H.-Q., 2012. Kynurenines in the mammalian brain: when physiology meets pathology. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 465–477.

<https://doi.org/10.1038/nrn3257>

Targa, A.D.S., Nosedá, A.C.D., Rodrigues, L.S., Aurich, M.F., Lima, M.M.S., 2018. REM sleep deprivation and dopaminergic D2 receptors modulation increase recognition memory in an animal model of Parkinson's disease. *Behav. Brain Res.* 339, 239–248.

<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.11.008>

Targa, A.D.S., Rodrigues, L.S., Nosedá, A.C.D., Aurich, M.F., Andersen, M.L., Tufik, S., Da Cunha, C., Lima, M.M.S., 2016. Unraveling a new circuitry for sleep regulation in Parkinson's disease. *Neuropharmacology* 108, 161–171.

<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.04.018>

Vécsei, L., Szalárdy, L., Fülöp, F., Toldi, J., 2013. Kynurenines in the CNS: recent advances and new questions. *Nat. Rev. Drug Discov.* 12, 64–82.

<https://doi.org/10.1038/nrd3793>

Volders, P.-J., Anckaert, J., Verheggen, K., Nuytens, J., Martens, L., Mestdagh, P., Vandesompele, J., 2019. LNCipedia 5: towards a reference set of human long non-coding RNAs. *Nucleic Acids Res.* 47, D135–D139. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1031>

Wüllner, U., Kaut, O., DeBoni, L., Piston, D., Schmitt, I., 2016. DNA methylation in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 139, 108–120. <https://doi.org/10.1111/jnc.13646>

Xie, C., Yuan, J., Li, H., Li, M., Zhao, G., Bu, D., Zhu, W., Wu, W., Chen, R., Zhao, Y., 2014. NONCODEv4: exploring the world of long non-coding RNA genes. *Nucleic Acids Res.* 42, D98–D103. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1222>

Xie, Y., Feng, H., Peng, S., Xiao, J., Zhang, J., 2017. Association of plasma homocysteine, vitamin B12 and folate levels with cognitive function in Parkinson's disease: A meta-analysis. *Neurosci. Lett.* 636, 190–195. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.11.007>

Xu, Z., Li, H., Jin, P., 2012. Epigenetics-Based Therapeutics for Neurodegenerative Disorders. *Curr. Geriatr. Reports* 1, 229–236. <https://doi.org/10.1007/s13670-012-0027-0>

Zesiewicz, T.A., 2019. Parkinson Disease. *Contin. Lifelong Learn. Neurol.* 25, 896–918.

<https://doi.org/10.1212/CON.0000000000000764>

Zinger, A., Barcia, C., Herrero, M.T., Guillemin, G.J., 2011. The Involvement of Neuroinflammation and Kynurenine Pathway in Parkinson's Disease. *Parkinsons. Dis.* 2011, 1–11. <https://doi.org/10.4061/2011/716859>

9.11 SUPPLEMENTARY MATERIAL

SUPPLEMENTARY TABLE S1 – *Kynu* PRIMER SEQUENCE DESIGN FOR PYROSEQUENCING.

Primer	5'-3' Sequence	Nt	T _m °C	%GC
Forward	AAGAGTTGGAAGAGAGGTTGTTAGT	23	60.8	39.1
Reverse -biotinylated	CTCCACCCCTATAAAAAATTTACATATCAAC	30	59.1	30
Sequencing	GGTTGTTAGTAGAGTTAGAT	20	45.4	35
Sequence with marked primers				
AAGAGTTGGA AGAGGTTGTT AGT				
GGTTGTT AGTAGAGTTA GAT				
271	AAGAGTTGGA AGAGGTTGTT AGTAGAGTTA GATGTTTGGT AAGTTGGGGT GGGGATGGGG GAGGTGTYGT ATTTTGTTTA GTTTTTGTTG			
<i>cg1</i>				
361	GTGGTTAGAA ATTTGTAATT YGATTTAATT GGGTGGGAGG AATTAAGTT GATATGTAAA TTTTATATAG GGTGGAG 438			
CAA CTATACATTT AAAAAATATC CCACCTC				

The primers were designed using the PyroMark Assay Design 2.0 (Qiagen) considering the promoter sequence of *Kynu* gene in the RGC6.0/rn6 rat genome. The software provides a score of reliability for the primers generated, and the highest option was chosen (93%). The CpG sites analyzed are represented in red. The *cg2* is orthologous to *cg15836722* in the *KYNU* human promoter and is the closest CpG to the transcription start site.

SUPPLEMENTARY TABLE S2 – PYROSEQUENCING PCR PROTOCOL.

Reagents	[Initial]	[Final]
RNase-Free Water	0	0
PyroMark PCR Master Mix, 2x	2	1
CoralLoad Concentrate, 10x	10	1
MgCl ₂ (mM)	25	2
Primer set (nmol)	2.54	0.2
DNA converted with bisulfite (ng/ul)	20	
Total		
Expected products		
<i>Kynu</i>		167 bp

We used the PyroMark PCR kit (Qiagen) and evaluated quality of PCR amplification in 1.5% agarose gel electrophoresis.

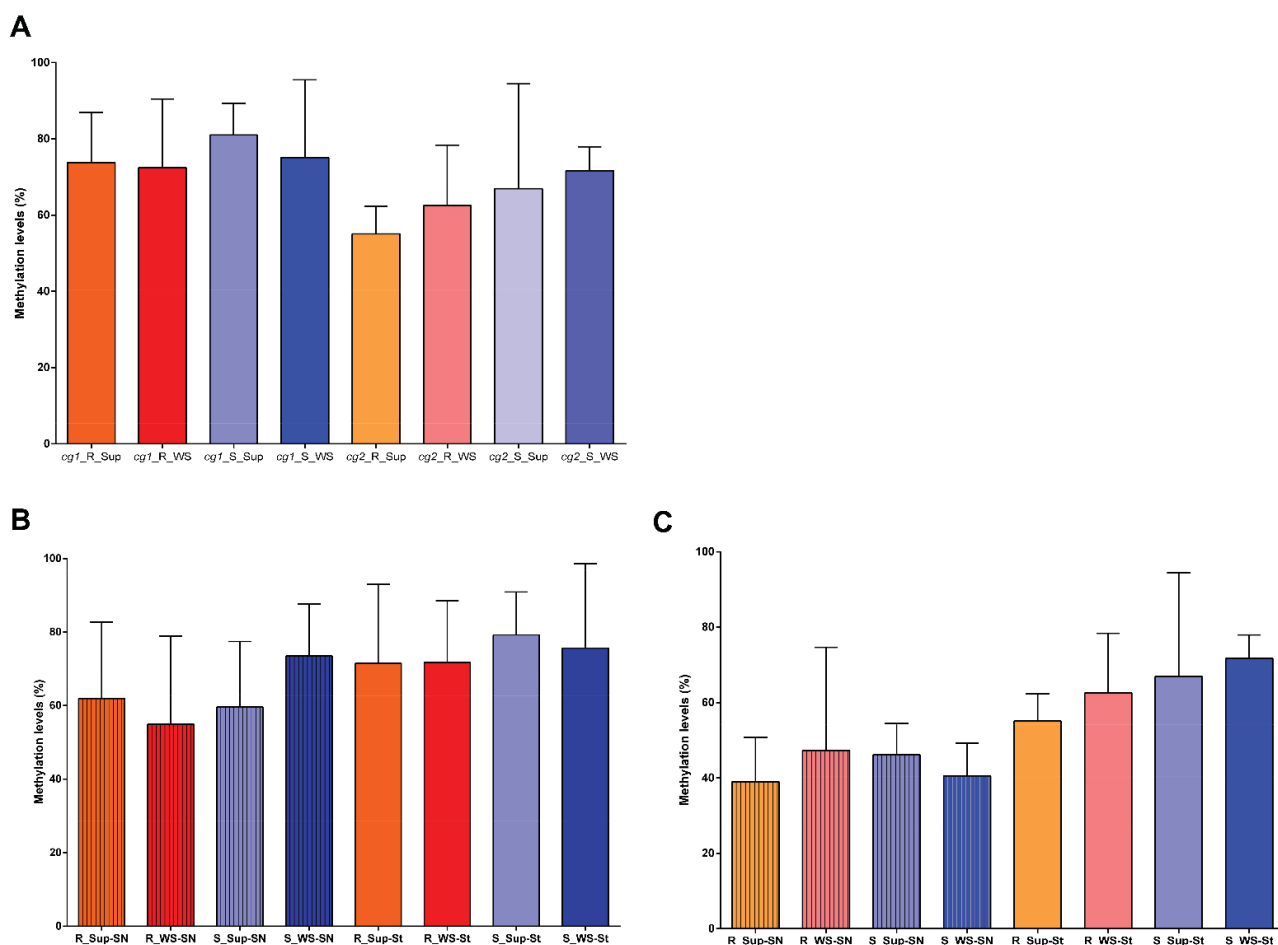
SUPPLEMENTARY TABLE S3 – PRIMER SEQUENCE DESIGN FOR *Kynu* EXPRESSION ANALYSIS.

Gene	Primer	5'-3' Sequence	Nt	Tm°C	%CG	bp
<i>Kynu</i>	F	TCTGTGACAAGCGAGAACCA	20	59.25	50	113
	R	TGTAGAGTCGAGTATGGCAGTAAG	24	59.42	45.83	
<i>Actb</i> *	F	TGTCACCAACTGGGACGATA	20	58.37	50	166
	R	GGGGTGTGAAAGGTCTCAAA	21	58.34	47.62	
<i>Hprt1</i> *	F	GCAGACTTTGCTTTCCTTGG	20	57.57	50	81
	R	CGAGAGGTCCTTTCACCAG	20	57.91	55	

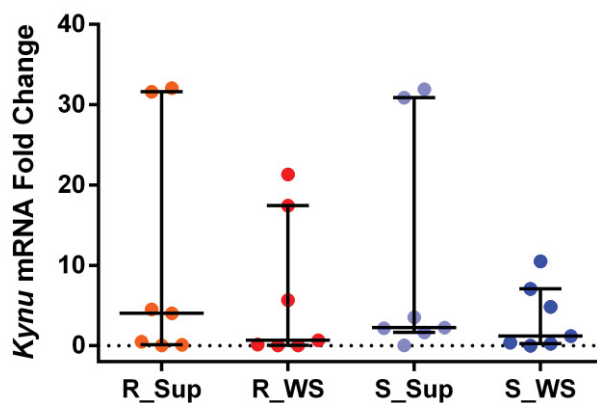
* Primer sequences already described by Elfving et al., (2019).

SUPPLEMENTARY TABLE S4 – qPCR PROTOCOL.

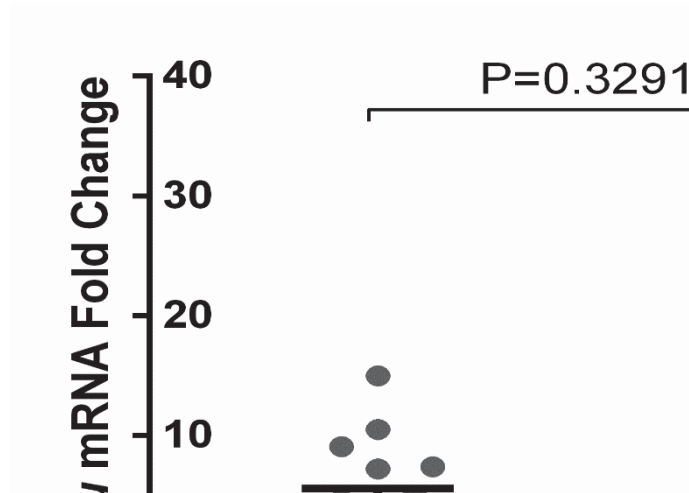
Reagents	[Initial]	[Final]
Rnase-Free Water	0	0
GO Taq Master Mix, 2x	2	1
Primer Forward (uM)	10	10
Primer Reverse (uM)	10	10
cDNA (ng/ul)	12.5	12.5

SUPPLEMENTARY FIGURE S5 – *Kynu* METHYLATION LEVELS.

A- Methylation levels of cg1 and cg2 in the analyzed groups in Striatum; **B-** Methylation levels for cg1 between analyzed groups and different brain regions; **C-** Methylation levels for cg2 between analyzed groups and different brain regions; R_Sup = rotenone supplemented; R_WS = rotenone without supplementation; S_Sup = sham supplemented; S_WS = sham without supplementation. In B and C, the striped columns refer to the SN region. No significant differences were found, between the groups.

SUPPLEMENTARY FIGURE S6– *Kynu* EXPRESSION IN STRIATUM.

There were no significant changes in *Kynu* expression between groups in Striatum. R_Sup = rotenone supplemented; R_WS = rotenone without supplementation; S_Sup = sham supplemented; S_WS = sham without supplementation.

SUPPLEMENTARY FIGURE S7– *Kynu* EXPRESSION AMONG SUBSTANTIA NIGRA AND STRIATUM

There were no significant changes in *Kynu* expression between the Substantia nigra and Striatum

10 CONCLUSÕES

Nosso trabalho trouxe importantes contribuições para o entendimento da fisiopatologia das DA e DP, apontando para possíveis novos alvos terapêuticos e trazendo novas perspectivas para futuros trabalhos.

Através dos estudos de associação realizados nessa pesquisa, onde buscou-se a replicação na população Sul-brasileira das associações genéticas à DA observadas na população europeia, ficou evidente a influência do *background* genético populacional, visto que grande parte das associações anteriormente relatadas em estudos GWAS, não foram replicadas (embora o tamanho amostral empregado em nosso trabalho seja muito menor que os utilizados em GWAS). Isso ressalta a importância da replicação de associações em diferentes grupos populacionais, a fim de se obter futuramente uma medicina mais personalizada e inclusiva.

O nosso estudo foi o primeiro a encontrar associações de alguns dos polimorfismos de *CR1* com DA, numa população latino-americana. Embora a associação com rs6656401, previamente identificada em GWAS, não tenha sido validada na nossa população, o rs3849266, até então não investigado para DA, encontrou-se associado com a susceptibilidade a DA, quando em haplótipo com rs2274567 (*CA/CA*), evidenciando a importância da investigação de SNPs em regiões regulatórias e de análises em haplótipos. Além disso, também observamos o aumento de *CR1* solúvel (sCR1) no plasma de pacientes de DA, assim como a associação do alelo *rs2274567*G* com o aumento dos níveis de sCR1, que pode estar prejudicando a depuração das placas β -amiloides.

Também ressaltamos a importância da validação funcional, mesmo que *in silico*, de variantes associadas em estudos populacionais, visto que grande parte delas não é causal. Dos 18 SNPs relatados como associados à DA na população europeia, apenas quatro foram replicados na população sul-brasileira: rs769449 (*APOE*), rs10838725 (*CELF1*), rs6733839 e rs744373 (*BIN1-CYP27C1*). Embora haja na literatura alguns trabalhos que buscam uma explicação funcional para essas associações, nenhum deles havia correlacionado esses polimorfismos ou suas variantes em desequilíbrio de ligação (DL) com lncRNAs. Através de intensa investigação *in silico*, observamos que o rs744373 e oito das 54 variantes em DL com os SNPs associados encontram-se em regiões de lncRNAs (até então não relatados

como associados a DA), podendo alterar sua estrutura e interação com miRNAs. Vale ressaltar que o rs429358 (em DL com rs769449), responsável pela isoforma APOE* ϵ 4, altera sítios de ligação de miRNA em dois lncRNAs, podendo inclusive resultar em alterações conformacionais da estrutura secundária do lncRNA, função ainda não relatada para esse polimorfismo. Além disso, 43 variantes em DL com os SNPs associados, juntamente com os rs10838725 e rs769449, apresentam efeito eQTL / sQTL no cérebro ou sangue total, regulando genes que já foram relatados como associados a DA (*CELF1*, *MADD*, *MYBPC3*, *NR1H3*, *NUP160*, *SPI1* e *TOMM40*). Nosso estudo abre portas para futuras pesquisas com os lncRNAs candidatos e investigação do possível papel desses na fisiopatologia da DA.

Pela primeira vez, evidenciamos a formação de uma maior quantidade de NETs no plasma de pacientes sul-brasileiros com DA. Ainda são poucos os trabalhos na literatura sobre esse processo na DA. O nosso é o primeiro a discutir a participação do sistema complemento no recrutamento dos neutrófilos a regiões de depósitos de placas β A, especialmente pela anafilatoxina C5a. Além disso, levantamos a possibilidade do envolvimento do CR1 na promoção de NETs, visto que essa molécula é associada a DA e recentemente foi associada com um aumento na formação de NETs. Nosso trabalho instiga mais estudos focando na interação do sistema complemento e NETs e abre novas possibilidades de alvos terapêuticos para DA. Através do nosso trabalho com um modelo animal de DP, evidenciamos que uma intervenção simples com suplementação de ácido fólico e vitamina B12 pode prevenir o comprometimento da memória causado pela rotenona, mantendo a expressão do gene *Kynu*, sem interferir na metilação de dois sítios CpG críticos na região promotora do gene, provavelmente mantendo a homeostase das vias dependentes de *Kynu*. Provavelmente, a intervenção preveniu desregulações na via das quinureninas, geradas pela escassez de enzimas fundamentais, tais como a KYNU, e que podem levar ao acúmulo de metabólitos neurotóxicos, resultando em um processo de neurodegeneração. Dessa forma, nossos resultados abrem novas oportunidades de investigação dentro da via das quinureninas e da DP. Além disso, reforça a possibilidade da suplementação com ácido fólico e vitamina B12 como terapia auxiliar para redução de sintomas dos pacientes com DP, embora a replicação nos nossos resultados em estudos com outros modelos de DP e posteriormente com humanos sejam necessários para sua validação e aprovação.

REFERÊNCIAS

- ABEYSINGHE, A. A. D. T.; DESHAPRIYA, R. D. U. S.; UDAWATTE, C. Alzheimer's disease; a review of the pathophysiological basis and therapeutic interventions. **Life Sciences**, v. 256, p. 117996, 2020. Elsevier Inc. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117996>>.
- ABRAMS, S. T.; MORTON, B.; ALHAMDI, Y.; et al. A novel assay for neutrophil extracellular trap formation independently predicts disseminated intravascular coagulation and mortality in critically ill patients. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 200, n. 7, p. 869–880, 2019.
- AGARWAL, V.; BELL, G. W.; NAM, J.-W.; BARTEL, D. P. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. **eLife**, v. 4, n. AUGUST2015, p. 1–38, 2015. Disponível em: <<https://elifesciences.org/articles/05005>>.
- AHMAD, M. H.; FATIMA, M.; MONDAL, A. C. Influence of microglia and astrocyte activation in the neuroinflammatory pathogenesis of Alzheimer's disease: Rational insights for the therapeutic approaches. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 59, p. 6–11, 2019. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jocn.2018.10.034>>.
- ALBERT, F. W.; KRUGLYAK, L. The role of regulatory variation in complex traits and disease. **Nature Reviews Genetics**, v. 16, n. 4, p. 197–212, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrg3891>>.
- ALLIS, C. D.; CAPARROS, M.-L.; JENUWEIN, T.; LACHNER, M.; REINBERG, D. Overview and Concepts. **Epigenetics**. p.47–115, 2015. Cold Spring Harbor.
- ALMEIDA, M. I.; REIS, R. M.; CALIN, G. A. MicroRNA history: Discovery, recent applications, and next frontiers. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 717, n. 1–2, p. 1–8, 2011. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.03.009>>.
- ALZHEIMER'S-ASSOCIATION. Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimer's & Dementia**, v. 16, n. 3, p. 391–460, 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/alz.12068>>.
- ALZHEIMER, A. Uber eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. **Zentralbl. Nervenhe. Psych.**, v. 18, p. 177–179, 1907.
- ALZHEIMER EUROPE. Discussion paper on ethical issues linked to the changing definitions / use of terms related to Alzheimer's disease. **Alzheimer Europe**, p. 1–37, 2016. Disponível em: <<https://www.alzheimer-europe.org/Ethics/Ethical-issues-in-practice/2016-Ethical-issues-linked-to-the-changing-definitions-use-of-terms-related-to-Alzheimer-s-disease>>.
- AN, X. Q.; XI, W.; GU, C. Y.; HUANG, X. Complement protein C5a enhances the β -amyloid-induced neuro-inflammatory response in microglia in Alzheimer's disease. **Medecine/Sciences**, v. 34, n. october, p. 116–120, 2018.

ANDRÉS-LEÓN, E.; GONZÁLEZ PEÑA, D.; GÓMEZ-LÓPEZ, G.; PISANO, D. G. miRGate: a curated database of human, mouse and rat miRNA–mRNA targets. **Database**, v. 2015, p. 1–9, 2015.

ANGOT, E.; STEINER, J. A.; HANSEN, C.; LI, J.-Y.; BRUNDIN, P. Are synucleinopathies prion-like disorders? **The Lancet Neurology**, v. 9, n. 11, p. 1128–1138, 2010. Elsevier Ltd. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70213-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70213-1)>.

ARAÚJO, J. R.; MARTEL, F.; BORGES, N.; ARAÚJO, J. M.; KEATING, E. Foliates and aging: Role in mild cognitive impairment, dementia and depression. **Ageing Research Reviews**, v. 22, p. 9–19, 2015. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2015.04.005>>.

ARDLIE, K. G.; DELUCA, D. S.; SEGRE, A. V.; et al. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) pilot analysis: Multitissue gene regulation in humans. **Science**, v. 348, n. 6235, p. 648–660, 2015.

ARPAWONG, T. E.; PENDLETON, N.; MEKLI, K.; et al. Genetic variants specific to aging-related verbal memory: Insights from GWASs in a population-based cohort. **PLoS ONE**, 2017.

ARSHAVSKY, Y. I. Alzheimer's Disease: From Amyloid to Autoimmune Hypothesis. **Neuroscientist**, 2020.

ASSOCIATION, A. Alzheimer's Disease Facts and Figures. **Alzheimer's Association**, , n. 13, p. 325–373, 2017.

AURICH, M. F.; RODRIGUES, L. S.; TARGA, A. D. S.; et al. Olfactory impairment is related to REM sleep deprivation in rotenone model of Parkinson's disease. **Sleep Science**, v. 10, n. 1, p. 47–54, 2017.

BABENKO, V. N.; AFONNIKOV, D. A.; IGNATIEVA, E. V.; et al. Haplotype analysis of APOE intragenic SNPs. **BMC Neuroscience**, v. 19, n. S1, p. 16, 2018. Disponível em: <<https://bmcneurosci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12868-018-0413-4>>.

BAIK, S. H.; CHA, M. Y.; HYUN, Y. M.; et al. Migration of neutrophils targeting amyloid plaques in Alzheimer's disease mouse model. **Neurobiology of Aging**, v. 35, n. 6, p. 1286–1292, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.01.003>>.

BAILEY, M.; ANDERSON, S.; HALL, D. A. Parkinson's Disease in African Americans: A Review of the Current Literature. **Journal of Parkinson's Disease**, p. 1–11, 2020.

BAO, Z.; YANG, Z.; HUANG, Z.; et al. LncRNADisease 2.0: an updated database of long non-coding RNA-associated diseases. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D1034–D1037, 2019.

BARAN, H.; SCHWARCZ, R. Presence of 3-Hydroxyanthranilic Acid in Rat Tissues and Evidence for Its Production from Anthranilic Acid in the Brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 55, n. 3, p. 738–744, 1990. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1471-4159.1990.tb04553.x>>.

BARBOSA, E. R.; SALLEM, F. A. S. Doença de Parkinson - Diagnóstico. **Revista Neurociências**, v. 13, n. 3, p. 158–165, 2005.

BARICHELLA, M.; MARCZEWSKA, A.; NOTARIS, R. DE; et al. Special low-protein foods ameliorate postprandial off in patients with advanced Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 21, n. 10, p. 1682–1687, 2006. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/mds.21003>>.

BASTIDE, M. F.; MEISSNER, W. G.; PICCONI, B.; et al. Pathophysiology of L-dopa-induced motor and non-motor complications in Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**, v. 132, p. 96–168, 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301008215000763>>.

BATEMAN, A.; MARTIN, M. J.; O'DONOVAN, C.; et al. UniProt: The universal protein knowledgebase. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D158–D169, 2017. Oxford University Press.

BATTLE, A.; MONTGOMERY, S. B. Determining causality and consequence of expression quantitative trait loci. **Human Genetics**, v. 133, n. 6, p. 727–735, 2014. Disponível em: <10.1007/s00439-014-1446-0>.

BAYRAKTAR, G.; KREUTZ, M. R. Neuronal DNA Methyltransferases: Epigenetic Mediators between Synaptic Activity and Gene Expression? **The Neuroscientist**, v. 24, n. 2, p. 171–185, 2018.

BEAL, M. F.; MATSON, W. R.; SWARTZ, K. J.; GAMACHE, P. H.; BIRD, E. D. Kynurenine Pathway Measurements in Huntington's Disease Striatum: Evidence for Reduced Formation of Kynurenic Acid. **Journal of Neurochemistry**, v. 55, n. 4, p. 1327–1339, 1990. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1471-4159.1990.tb03143.x>>.

BEISANG, D.; R., P.; VLASOVA-ST. LOUIS, I. A. CELF1, a Multifunctional Regulator of Posttranscriptional Networks. **Binding Protein**, 2012. InTech. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/binding-protein/celf1-a-multifunctional-regulator-of-posttranscriptional-networks>>.

BEN-JOSEPH, A.; MARSHALL, C. R.; LEES, A. J.; NOYCE, A. J. Ethnic Variation in the Manifestation of Parkinson's Disease: A Narrative Review. **Journal of Parkinson's Disease**, v. 10, n. 1, p. 31–45, 2020.

BENDER, D. A.; MCCREANOR, G. M. The preferred route of kynurenine metabolism in the rat. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 717, n. 1, p. 56–60, 1982. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0304416582903798>>.

BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. **J.R. Statist. Soc. B**, v. 57, n. 1, p. 289–300, 1995.

BIRMINGHAM, D. J.; HEBERT, L. A. Cr1 and Cr1-like: the primate immune adherence receptors. **Immunological Reviews**, v. 180, p. 100–111, 2001.

BLAUWENDRAAT, C.; NALLS, M. A.; SINGLETON, A. B. The genetic architecture of Parkinson's disease. **The Lancet Neurology**, v. 19, n. 2, p. 170–178, 2020. Elsevier Ltd. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(19\)30287-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(19)30287-X)>.

BOACKLE, S. A. Complement and autoimmunity. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 57, n. 7, p. 269–273, 2003.

BOLMONT, T.; HAISS, F.; EICKE, D.; et al. Dynamics of the Microglial/Amyloid Interaction Indicate a Role in Plaque Maintenance. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 16, p. 4283–4292, 2008.

BONT, C. M. DE; BOELEN, W. C.; PRUIJN, G. J. M. NETosis, complement, and coagulation: a triangular relationship. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 16, n. 1, p. 19–27, 2019. Springer US. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41423-018-0024-0>>.

BOOPATHI, N. M. QTL Analysis. **Genetic Mapping and Marker Assisted Selection**. p.253–326, 2020. Singapore: Springer Singapore. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-981-15-2949-8_7>.

BOROS, F. A.; BOHÁR, Z.; VÉCSEI, L. Genetic alterations affecting the genes encoding the enzymes of the kynurenine pathway and their association with human diseases. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 776, n. December 2017, p. 32–45, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2018.03.001>>.

BOSE, A.; BEAL, M. F. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 139, p. 216–231, 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/jnc.13731>>.

BRAAK, H.; BRAAK, E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. **Acta Neuropathologica**, v. 82, n. 4, p. 239–259, 1991. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF00308809%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1759558>>.

BRAAK, H.; TREDICI, K. DEL; RÜB, U.; et al. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 24, n. 2, p. 197–211, 2003.

BRETTSCHEIDER, J.; TREDICI, K. DEL; LEE, V. M.-Y.; TROJANOWSKI, J. Q. Spreading of pathology in neurodegenerative diseases: a focus on human studies. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, n. 2, p. 109–120, 2015. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4312418&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

BRINKMANN, V.; REICHARD, U.; GOOSMANN, C.; et al. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. **Science**, v. 303, n. 5663, p. 1532–1535, 2004.

BROSSERON, F.; KRAUTHAUSEN, M.; KUMMER, M.; HENEKA, M. T. Body Fluid Cytokine Levels in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease: a Comparative Overview. **Molecular Neurobiology**, v. 50, n. 2, p. 534–544, 2014.

BROUWERS, N.; CAUWENBERGHE, C. VAN; ENGELBORGH, S.; et al. Alzheimer risk associated with a copy number variation in the complement receptor 1 increasing

C3b/C4b binding sites. **Molecular Psychiatry**, v. 17, n. 2, p. 223–233, 2012.

BRUFORD, E. A.; BRASCHI, B.; DENNY, P.; et al. Guidelines for human gene nomenclature. **Nature Genetics**, v. 52, n. 8, p. 754–758, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41588-020-0669-3>>.

BRUNDIN, P.; MELKI, R.; KOPITO, R. Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 4, p. 301–307, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrm2873>>.

BUNIELLO, A.; MACARTHUR, J. A. L.; CERESO, M.; et al. The NHGRI-EBI GWAS Catalog of published genome-wide association studies, targeted arrays and summary statistics 2019. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D1005–D1012, 2019. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar/article/47/D1/D1005/5184712>>.

BURRÉ, J. The Synaptic Function of α -Synuclein. **Journal of Parkinson's Disease**, v. 5, n. 4, p. 699–713, 2015.

CALIGIORE, D.; HELMICH, R. C.; HALLETT, M.; et al. Parkinson's disease as a system-level disorder. **npj Parkinson's Disease**, v. 2, n. 1, p. 16025, 2016. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/npjparkd.2016.25>>.

CANOBBIO, I.; ABUBAKER, A. A.; VISCONTE, C.; TORTI, M.; PULA, G. Role of amyloid peptides in vascular dysfunction and platelet dysregulation in Alzheimer's disease. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 9, n. MAR, p. 1–15, 2015.

CARAMELLI, P.; BARBOSA, M. T. Como diagnosticar as quatro causas mais frequentes de demência? **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 24, n. suppl 1, p. 7–10, 2002.

CARMONA, S.; HARDY, J.; GUERREIRO, R. The genetic landscape of Alzheimer disease. **Handbook of Clinical Neurology**. 1st ed., v. 148, p.395–408, 2018. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-64076-5.00026-0>>.

CARPANINI, S. M.; TORVELL, M.; MORGAN, B. P. Therapeutic inhibition of the complement system in diseases of the central nervous system. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. MAR, p. 1–17, 2019.

CASTELLANO, J. M.; KIM, J.; STEWART, F. R.; et al. Human apoE Isoforms Differentially Regulate Brain Amyloid- Peptide Clearance. **Science Translational Medicine**, v. 3, n. 89, p. 89ra57-89ra57, 2011. Disponível em: <<http://stm.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/scitranslmed.3002156>>.

CERAVOLO, R.; COSSU, G.; BANDETTINI DI POGGIO, M.; et al. Neuropathy and levodopa in Parkinson's disease: Evidence from a multicenter study. **Movement Disorders**, v. 28, n. 10, p. 1391–1397, 2013.

CEREDA, E.; BARICHELLA, M.; PEZZOLI, G. Controlled-protein dietary regimens for Parkinson's disease. **Nutritional Neuroscience**, v. 13, n. 1, p. 29–32, 2010.

CERVENKA, I.; AGUDELO, L. Z.; RUAS, J. L. Kynurenines: Tryptophan's metabolites in exercise, inflammation, and mental health. **Science**, v. 357, n. 6349, p. eaaf9794,

2017.

CHANG, K. H.; CHENG, M. L.; TANG, H. Y.; et al. Alternations of Metabolic Profile and Kynurenine Metabolism in the Plasma of Parkinson's Disease. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 8, p. 6319–6328, 2018.

CHARVIN, D.; MEDORI, R.; HAUSER, R. A.; RASCOL, O. Therapeutic strategies for Parkinson disease: beyond dopaminergic drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 17, n. 11, p. 804–822, 2018. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrd.2018.136>>.

CHRISTENSEN, M.; DUNO, M.; LUND, A. M.; SKOVBY, F.; CHRISTENSEN, E. Xanthurenic aciduria due to a mutation in KYNU encoding kynureninase. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 30, n. 2, p. 248–255, 2007.

CHRISTINE, C. W.; AUINGER, P.; JOSLIN, A.; YELPAALA, Y.; GREEN, R. Vitamin B12 and Homocysteine Levels Predict Different Outcomes in Early Parkinson's Disease. **Movement Disorders**, v. 33, n. 5, p. 762–770, 2018.

CHRISTINE, C. W.; AUINGER, P.; SALEH, N.; et al. Relationship of Cerebrospinal Fluid Vitamin B12 Status Markers With Parkinson's Disease Progression. **Movement Disorders**, p. mds.28073, 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/mds.28073>>.

CIPOLLA, G.; OLIVEIRA, J. DE; SALVIANO-SILVA, A.; et al. Long Non-Coding RNAs in Multifactorial Diseases: Another Layer of Complexity. **Non-Coding RNA**, v. 4, n. 2, p. 13, 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2311-553X/4/2/13>>.

COLÓN, D. F.; WANDERLEY, C. W.; FRANCHIN, M.; et al. Neutrophil extracellular traps (NETs) exacerbate severity of infant sepsis. **Critical Care**, v. 23, n. 1, p. 1–13, 2019. Critical Care.

CONSORTIUM, T. 1000 G. P. A map of human genome variation from population-scale sequencing. **Nature**, v. 467, n. 7319, p. 1061–73, 2010.

COPPEDÈ, F. The potential of epigenetic therapies in neurodegenerative diseases. **Frontiers in Genetics**, v. 5, 2014.

CORDER, E. H.; SAUNDERS, A. M.; STRITTMATTER, W. J.; et al. Gene Dose of Apolipoprotein E Type 4 Allele and the Risk of Alzheimer's Disease in Late Onset Families Published by : American Association for the Advancement of Science Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/2882127>. **Advancement Of Science**, v. 261, n. 5123, p. 921–923, 2008.

CORTI, O.; LESAGE, S.; BRICE, A. What Genetics Tells us About the Causes and Mechanisms of Parkinson's Disease. **Physiological Reviews**, v. 91, n. 4, p. 1161–1218, 2011.

COUPLAND, K. G.; MELLICK, G. D.; SILBURN, P. A.; et al. DNA methylation of the MAPT gene in Parkinson's disease cohorts and modulation by vitamin E In Vitro. **Movement Disorders**, v. 29, n. 13, p. 1606–1614, 2014.

CROTTI, A.; SAIT, H. R.; MCAVOY, K. M.; et al. BIN1 favors the spreading of Tau via extracellular vesicles. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 9477, 2019. Nature Publishing Group. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-019-45676-0>>. Acesso em: 12/9/2020.

CRUCHAGA, C.; KAUWE, J. S. K.; HARARI, O.; et al. GWAS of Cerebrospinal Fluid Tau Levels Identifies Risk Variants for Alzheimer's Disease. **Neuron**, v. 78, n. 2, p. 256–268, 2013.

CUMMINGS, A. C.; JIANG, L.; VELEZ EDWARDS, D. R.; et al. Genome-Wide Association and Linkage Study in the Amish Detects a Novel Candidate Late-Onset Alzheimer Disease Gene. **Annals of Human Genetics**, v. 76, n. 5, p. 342–351, 2012.

CZAIKOSKI, P. G.; MOTA, J. M. S. C.; NASCIMENTO, D. C.; et al. Neutrophil extracellular traps induce organ damage during experimental and clinical sepsis. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, 2016.

CZIRR, E.; WYSS-CORAY, T. The immunology of neurodegeneration. **Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 4, p. 1156–1163, 2012. Disponível em: <<http://www.jci.org/articles/view/58656>>.

DABORG, J.; ANDREASSON, U.; PEKNA, M.; et al. Cerebrospinal fluid levels of complement proteins C3, C4 and CR1 in Alzheimer's disease. **Journal of Neural Transmission**, v. 119, n. 7, p. 789–797, 2012.

DANIELSSON, C.; PASCUAL, M.; FRENCH, L.; STEIGER, G.; SCHIFFERLI, J.-A. Soluble complement receptor type 1 (CD35) is released from leukocytes by surface cleavage. **European Journal of Immunology**, v. 24, p. 2725–2731, 1994.

DANSOKHO, C.; HENEKA, M. T. Neuroinflammatory responses in Alzheimer's disease. **Journal of Neural Transmission**, v. 125, n. 5, p. 771–779, 2018. Springer Vienna. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00702-017-1831-7>>.

DAUJAT, S.; ZEISSLER, U.; WALDMANN, T.; HAPPEL, N.; SCHNEIDER, R. HP1 Binds Specifically to Lys 26 -methylated Histone H1.4, whereas Simultaneous Ser 27 Phosphorylation Blocks HP1 Binding. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 45, p. 38090–38095, 2005.

DAVID, G.; REBOUTIER, D.; DESCHAMPS, S.; et al. The RNA-binding proteins CELF1 and ELAVL1 cooperatively control RNA isoform production. **bioRxiv**, 2020.

DEJANOVIC, B.; HUNTLEY, M. A.; MAZIÈRE, A. DE; et al. Changes in the Synaptic Proteome in Tauopathy and Rescue of Tau-Induced Synapse Loss by C1q Antibodies. **Neuron**, v. 100, n. 6, p. 1322–1336.e7, 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627318309024>>.

DERRIEN, T.; JOHNSON, R.; BUSSOTTI, G.; et al. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: Analysis of their gene structure, evolution, and expression. **Genome Research**, v. 22, n. 9, p. 1775–1789, 2012. Disponível em: <<http://genome.cshlp.org/cgi/doi/10.1101/gr.132159.111>>.

DERVILLEZ, X.; OUDIN, S.; LIBYH, M. T.; et al. Catabolism of the human erythrocyte

C3b/C4b receptor (CR1, CD35): vesiculation and/or proteolysis? **Immunopharmacology**, v. 38, n. 1–2, p. 129–140, 1997. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0162310997000660>>.

DESIKAN, R. S.; SCHORK, A. J.; WANG, Y.; et al. Genetic overlap between Alzheimer's disease and Parkinson's disease at the MAPT locus. **Molecular Psychiatry**, v. 20, n. 12, p. 1588–1595, 2015. Nature Publishing Group. Disponível em: <www.nature.com/mp>.

DETURE, M. A.; DICKSON, D. W. The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. **Molecular Neurodegeneration**, v. 14, n. 1, p. 32, 2019. Molecular Neurodegeneration.

DEXTER, D. T.; JENNER, P. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 62, p. 132–144, 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584913000282>>.

DONG, Y.; LAGARDE, J.; XICOTA, L.; et al. Neutrophil hyperactivation correlates with Alzheimer's disease progression. **Annals of Neurology**, v. 83, n. 2, p. 387–405, 2018. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ana.25159>>.

DORSEY, E. . R.; CONSTANTINESCU, R.; THOMPSON, J. . P.; et al. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. **Neurology**, v. 68, n. 5, p. 384–386, 2007. Disponível em: <<http://www.neurology.org/cgi/doi/10.1212/01.wnl.0000271777.50910.73>>.

DOURLEN, P.; FERNANDEZ-GOMEZ, F. J.; DUPONT, C.; et al. Functional screening of Alzheimer risk loci identifies PTK2B as an in vivo modulator and early marker of Tau pathology. **Molecular Psychiatry**, v. 22, n. 6, p. 874–883, 2017. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/mp.2016.59>>.

DRAOUI, A.; HIBA, O. EL; AIMRANE, A.; KHIAT, A. EL; GAMRANI, H. Parkinson's disease: From bench to bedside. **Revue Neurologique**, v. 176, n. 7–8, p. 543–559, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.neurol.2019.11.002>>.

DU, X.; WANG, X.; GENG, M. Alzheimer's disease hypothesis and related therapies. **Translational Neurodegeneration**, v. 7, n. 1, p. 2, 2018. BioMed Central Ltd. Disponível em: <pmc/articles/PMC5789526/?report=abstract>.

DUAN, W.; LADENHEIM, B.; CUTLER, R. G.; et al. Dietary folate deficiency and elevated homocysteine levels endanger dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. **Journal of Neurochemistry**, 2002.

DUBOIS, B.; FELDMAN, H. H.; JACOVA, C.; et al. Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. **The Lancet Neurology**, v. 9, n. 11, p. 1118–1127, 2010.

DUBOIS, B.; PADOVANI, A.; SCHELTENS, P.; ROSSI, A.; DELL'AGNELLO, G. Timely Diagnosis for Alzheimer's Disease: A Literature Review on Benefits and Challenges. (A. Saykin, Ed.) **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 49, n. 3, p. 617–631, 2015.

DUDA, J. E.; GIASSON, B. I.; MABON, M. E.; LEE, V. M. Y.; TROJANOWSKI, J. Q. Novel antibodies to synuclein show abundant striatal pathology in Lewy body diseases. **Annals of Neurology**, v. 52, n. 2, p. 205–210, 2002.

DUNKELBERGER, J. R.; SONG, W. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. **Cell Research**, v. 20, n. 1, p. 34–50, 2010. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/cr.2009.139>>.

DUTHEY, B. Background Paper 6.11 Alzheimer Disease and other Dementias. **World Health Organization**, p. 1–77, 2013.

DYKMAN, T. R.; COLE, J. L.; IIDA, K.; ATKINSON, J. P. Polymorphism of human erythrocyte C3b/C4b receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 80, n. 6, p. 1698–1702, 1983.

DYKMAN, T. R. O. T.; HATCH, J. A.; ATKINSON, J. P. Polymorphism of the Human C3b/C4b Receptor: Identification of a Third Allele and Analysis of Receptor Phenotypes in families and Patients with Systemic Lupus Erythematosus. , v. 159, n. March, p. 691–703, 1984.

E CARVALHO, M. D. S.; YONAMINE, C. M.; MAS, C. D.; NUNES, D. F. S.; HAYASHI, M. A. F. METABOLISMO DO TRIPTOFANO EM TRANSTORNOS MENTAIS: UM ENFOQUE NA ESQUIZOFRENIA. **VITTALLE - Revista de Ciências da Saúde**, v. 29, n. 2, p. 44–56, 2017. Disponível em: <<https://periodicos.furg.br/vittalle/article/view/6550>>.

EHRENGRUBER, M. U.; GEISER, T.; DERANLEAU, D. A. Activation of human neutrophils by C3a and C5A: Comparison of the effects on shape changes, chemotaxis, secretion, respiratory burst. **FEBS Letters**, v. 346, p. 181–184, 1994.

ELBAZ, A.; CARCAILLON, L.; KAB, S.; MOISAN, F. Epidemiology of Parkinson's disease. **Revue Neurologique**, v. 172, n. 1, p. 14–26, 2016. Elsevier Masson SAS. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neurol.2015.09.012>>.

ELFVING, B.; MÜLLER, H. K.; OLIVERAS, I.; et al. Differential expression of synaptic markers regulated during neurodevelopment in a rat model of schizophrenia-like behavior. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 95, p. 109669, 2019.

ENGREITZ, J. M.; HAINES, J. E.; PEREZ, E. M.; et al. Local regulation of gene expression by lncRNA promoters, transcription and splicing. **Nature**, v. 539, n. 7629, p. 452–455, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature20149>>.

ERYILMAZ, I. E.; CECENER, G.; ERER, S.; et al. Epigenetic approach to early-onset Parkinson's disease: low methylation status of SNCA and PARK2 promoter regions. **Neurological Research**, v. 39, n. 11, p. 965–972, 2017. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01616412.2017.1368141>>.

ESCOTT-PRICE, V.; MYERS, A. J.; HUENTELMAN, M.; HARDY, J. Polygenic risk score analysis of pathologically confirmed Alzheimer disease. **Annals of Neurology**, v. 82, n. 2, p. 311–314, 2017.

FAGOTTI, J.; TARGA, A. D. S.; RODRIGUES, L. S.; et al. Chronic sleep restriction in the rotenone Parkinson's disease model in rats reveals peripheral early-phase biomarkers. **Scientific Reports**, 2019.

FALCO, A. DE; CUKIERMAN, D. S.; HAUSER-DAVIS, R. A.; REY, N. A. ALZHEIMER'S DISEASE: ETIOLOGICAL HYPOTHESES AND TREATMENT PERSPECTIVES. **Química Nova**, v. 39, n. 1, p. 63–80, 2015. Disponível em: <<http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/0100-4042.20150152>>.

FANG, S.; ZHANG, L.; GUO, J.; et al. NONCODEV5: a comprehensive annotation database for long non-coding RNAs. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. D1, p. D308–D314, 2018.

FARRERA, C.; FADEEL, B. Macrophage Clearance of Neutrophil Extracellular Traps Is a Silent Process. **The Journal of Immunology**, v. 191, n. 5, p. 2647–2656, 2013.

FATTAHI, F.; FRYDRYCH, L. M.; BIAN, G.; et al. Role of complement C5a and histones in septic cardiomyopathy. **Molecular Immunology**, v. 102, p. 32–41, 2018.

FERREIRA, M. I. **Níveis Séricos de Folato e Vitamina B12 em Doentes de Parkinson Tratados com Levodopa**, 2013. Universidade do Porto.

FERRETTI, M. T.; IULITA, M. F.; CAVEDO, E.; et al. Sex differences in Alzheimer disease — the gateway to precision medicine. **Nature Reviews Neurology**, v. 14, n. 8, p. 457–469, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41582-018-0032-9>>.

FISHILEVICH, S.; NUDEL, R.; RAPPAPORT, N.; et al. GeneHancer: genome-wide integration of enhancers and target genes in GeneCards. **Database : the journal of biological databases and curation**, v. 2017, p. 1–17, 2017.

FOLSTEIN, M. F.; FOLSTEIN, S. E.; MCHUGH, P. R. “Mini-mental state”: A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. **Journal of Psychiatric Research**, v. 12, n. 3, p. 189–198, 1975. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0022395675900266>>.

FONSECA, M. I.; MCGUIRE, S. O.; COUNTS, S. E.; TENNER, A. J. Complement activation fragment C5a receptors, CD88 and C5L2, are associated with neurofibrillary pathology. **Journal of Neuroinflammation**, v. 10, p. 1–12, 2013.

FONTES, A. DE J. V. **Terapia génica no tratamento da doença de Parkinson**, 2011. Universidade do Algarve. Disponível em: <<http://sapientia.ualg.pt/handle/10400.1/1755>>.

FORAKER, J.; MILLARD, S. P.; LEONG, L.; et al. The APOE Gene is Differentially Methylated in Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 48, n. 3, p. 745–755, 2015.

FRANZMEIER, N.; RUBINSKI, A.; NEITZEL, J.; EWERS, M. The BIN1 rs744373 SNP is associated with increased tau-PET levels and impaired memory. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1766, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41467-019-09564-5>>.

FREEMAN, D. M.; LOU, D.; LI, Y.; MARTOS, S. N.; WANG, Z. The conserved DNMT1-dependent methylation regions in human cells are vulnerable to neurotoxicant rotenone exposure. **Epigenetics and Chromatin**, v. 13, n. 1, p. 1–16, 2020. BioMed Central. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13072-020-00338-8>>.

FROTA, N. A. F.; NITRINI, R.; DAMASCENO, B. P.; et al. Critérios para diagnóstico de doença de Alzheimer. **Dementia & Neuropsychologia**, v. 5, n. 1, p. 5–10, 2011. Disponível em: <<http://www.fundaciondiabetes.org/infantil/178/criterios-de-diagnostico-ninos>>.

FROTA, N. A. F.; SIQUEIRA-NETO, J. I.; BALTHAZAR, M. L. F.; NITRINI, R. **Neurologia cognitiva e do envelhecimento - do conhecimento básico à abordagem clínica**. 1st ed. São Paulo: OmniFarma, 2016.

FUJIGAKI, H.; YAMAMOTO, Y.; SAITO, K. L-Tryptophan-kynurenine pathway enzymes are therapeutic target for neuropsychiatric diseases: Focus on cell type differences. **Neuropharmacology**, v. 112, p. 264–274, 2017. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0028390816300119>>.

FURTADO, P. B.; HUANG, C. Y.; IHYEMBE, D.; et al. The Partly Folded Back Solution Structure Arrangement of the 30 SCR Domains in Human Complement Receptor Type 1 (CR1) Permits Access to its C3b and C4b Ligands. **Journal of Molecular Biology**, v. 375, n. 1, p. 102–118, 2008.

GHIGLIERI, V.; CALABRESE, V.; CALABRESI, P. Alpha-Synuclein: From Early Synaptic Dysfunction to Neurodegeneration. **Frontiers in Neurology**, v. 9, n. MAY, 2018.

GHIRAN, I.; BARBASHOV, S. F.; KLICKSTEIN, L. B.; et al. Complement receptor 1/CD35 is a receptor for mannan-binding lectin. **The Journal of experimental medicine**, v. 192, n. 12, p. 1797–1807, 2000.

GIALELI, C.; GUNGOR, B.; BLOM, A. M. Novel potential inhibitors of complement system and their roles in complement regulation and beyond. **Molecular Immunology**, v. 102, n. June, p. 73–83, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.05.023>>.

GOETZL, E. J.; SCHWARTZ, J. B.; ABNER, E. L.; JICHA, G. A.; KAPOGIANNIS, D. High complement levels in astrocyte-derived exosomes of Alzheimer disease. **Annals of Neurology**, v. 83, n. 3, p. 544–552, 2018. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ana.25172>>.

GONG, J.; LIU, C.; LIU, W.; et al. An update of miRNASNP database for better SNP selection by GWAS data, miRNA expression and online tools. **Database**, v. 2015, p. 1–8, 2015.

GORGONE, G.; CURRÒ, M.; FERLAZZO, N.; et al. Coenzyme Q10, Hyperhomocysteinemia and MTHFR C677T Polymorphism in Levodopa-treated Parkinson's Disease Patients. **NeuroMolecular Medicine**, v. 14, n. 1, p. 84–90, 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12017-012-8174-1>>.

GREENBAUM, L.; RAVONA-SPRINGER, R.; LUBITZ, I.; et al. Potential contribution

of the Alzheimer's disease risk locus BIN1 to episodic memory performance in cognitively normal Type 2 diabetes elderly. **European Neuropsychopharmacology**, v. 26, n. 4, p. 787–795, 2016.

GROSSMAN, I.; LUTZ, M. W.; CRENSHAW, D. G.; et al. Alzheimer's disease: diagnostics, prognostics and the road to prevention. **EPMA Journal**, v. 1, n. 2, p. 293–303, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21124753>>.

GUHATHAKURTA, S.; BOK, E.; EVANGELISTA, B. A.; KIM, Y. S. Dereglulation of α -synuclein in Parkinson's disease: Insight from epigenetic structure and transcriptional regulation of SNCA. **Progress in Neurobiology**, v. 154, p. 21–36, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2017.04.004>>.

GUILLEMIN, G. J.; BREW, B. J. Implications of the kynurenine pathway and quinolinic acid in Alzheimer's disease. **Redox Report**, v. 7, n. 4, p. 199–206, 2002.

GUILLEMIN, G. J.; MEININGER, V.; BREW, B. J. Implications for the kynurenine pathway and quinolinic acid in amyotrophic lateral sclerosis. **Neurodegenerative Diseases**, v. 2, n. 3–4, p. 166–176, 2006.

GUO, J. U.; SU, Y.; SHIN, J. H.; et al. Distribution, recognition and regulation of non-CpG methylation in the adult mammalian brain. **Nature Neuroscience**, v. 17, n. 2, p. 215–222, 2014. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nn.3607>>.

HAHN, M. A.; QIU, R.; WU, X.; et al. Dynamics of 5-Hydroxymethylcytosine and Chromatin Marks in Mammalian Neurogenesis. **Cell Reports**, v. 3, n. 2, p. 291–300, 2013. The Authors. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2013.01.011>>.

HAIR, P. S.; ENOS, A. I.; KRISHNA, N. K.; CUNNION, K. M. Inhibition of immune complex complement activation and neutrophil extracellular trap formation by peptide inhibitor of complement C1. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1–12, 2018.

HAKKIM, A.; FURNROHR, B. G.; AMANN, K.; et al. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 21, p. 9813–9818, 2010. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0909927107>>.

HAMER, I.; PACCAUD, J.; BELIN, D.; MAEDER, C.; CARPENTIER, J. Soluble form of complement C3b/C4b receptor (CR1) results from a proteolytic cleavage in the C-terminal region of CR1 transmembrane domain. **Biochemical Journal**, v. 329, p. 183–190, 1998.

HAMPEL, H.; CARACI, F.; CUELLO, A. C.; et al. A Path Toward Precision Medicine for Neuroinflammatory Mechanisms in Alzheimer's Disease. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 2020.

HAN, S.; LIANG, Y.; LI, Y.; DU, W. Lncident: A Tool for Rapid Identification of Long Noncoding RNAs Utilizing Sequence Intrinsic Composition and Open Reading Frame Information. **International Journal of Genomics**, 2016.

HAN, Z.; XUE, W.; TAO, L.; ZHU, F. Identification of Key Long Non-Coding RNAs in the Pathology of Alzheimer's Disease and their Functions Based on Genome-Wide

Associations Study, Microarray, and RNA-seq Data. (J.-T. Yu, Ed.) **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 68, n. 1, p. 339–355, 2019. Disponível em: <<https://www.medra.org/servlet/aliasResolver?alias=iospress&doi=10.3233/JAD-181051>>.

HARDY, J. Genetic analysis of pathways to parkinson disease. **Neuron**, v. 68, n. 2, p. 201–206, 2010.

HARDY, J.; HIGGINS, G. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. **Science**, v. 256, n. 5054, p. 184–185, 1992. Disponível em: <<https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.1566067>>.

HAROLD, D.; ABRAHAM, R.; HOLLINGWORTH, P.; et al. Genome-wide association study identifies variants at *CLU* and *PICALM* associated with Alzheimer's disease. **Nature genetics**, v. 41, n. 10, p. 1088–93, 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2845877&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

HARTUNG, T.; ZHANG, L.; KHREBTUKOVA, I.; et al. Diametrically opposite methylome-transcriptome relationships in high- and low-CpG promoter genes in postmitotic neural rat tissue. **Epigenetics**, v. 7, n. 5, p. 421–428, 2012.

HAVELUND, J. F.; ANDERSEN, A. D.; BINZER, M.; et al. Changes in kynurenine pathway metabolism in Parkinson patients with L-DOPA-induced dyskinesia. **Journal of Neurochemistry**, v. 142, n. 5, p. 756–766, 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/jnc.14104>>.

HAYES, M. T. Parkinson's Disease and Parkinsonism. **The American Journal of Medicine**, v. 132, n. 7, p. 802–807, 2019. Elsevier Inc. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002934319302359>>.

HAZRATI, L. N.; CAUWENBERGHE, C. VAN; BROOKS, P. L.; et al. Genetic association of *CR1* with Alzheimer's disease: A tentative disease mechanism. **Neurobiology of Aging**, v. 33, n. 12, p. 2949.e5-2949.e12, 2012. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.07.001>>.

HEBERT, L. E.; WEUVE, J.; SCHERR, P. A.; EVANS, D. A. Alzheimer disease in the United States (2010-2050) estimated using the 2010 census. **Neurology**, v. 80, n. 19, p. 1778–1783, 2013.

HEESBEEN, H. J. VAN; SMIDT, M. P. Entanglement of Genetics and Epigenetics in Parkinson's Disease. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2019.00277/full>>.

HENDERSON-SMITH, A.; FISCH, K. M.; HUA, J.; et al. DNA methylation changes associated with Parkinson's disease progression: outcomes from the first longitudinal genome-wide methylation analysis in blood. **Epigenetics**, v. 14, n. 4, p. 365–382, 2019.

HENEKA, M. T.; CARSON, M. J.; KHOURY, J. EL; et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. **The Lancet Neurology**, v. 14, n. 4, p. 388–405, 2015.

HEPPNER, F. L.; RANSOHOFF, R. M.; BECHER, B. Immune attack: The role of inflammation in Alzheimer disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, n. 6, p. 358–372, 2015.

HERNÁN, M. A.; TAKKOUCHE, B.; CAAMAÑO-ISORNA, F.; GESTAL-OTERO, J. J. A meta-analysis of coffee drinking, cigarette smoking, and the risk of Parkinson's disease. **Annals of Neurology**, v. 52, n. 3, p. 276–284, 2002.

HEZRONI, H.; KOPPSTEIN, D.; SCHWARTZ, M. G.; et al. Principles of Long Noncoding RNA Evolution Derived from Direct Comparison of Transcriptomes in 17 Species. **Cell Reports**, v. 11, n. 7, p. 1110–1122, 2015. The Authors. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2015.04.023>>.

HICKMAN, S. E.; ALLISON, E. K.; KHOURY, J. EL. Microglial Dysfunction and Defective -Amyloid Clearance Pathways in Aging Alzheimer's Disease Mice. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 33, p. 8354–8360, 2008. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.0616-08.2008>>.

HINTERBERGER, M.; FISCHER, P. Folate and Alzheimer: when time matters. **Journal of Neural Transmission**, v. 120, n. 1, p. 211–224, 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00702-012-0822-y>>.

HOLLINGWORTH, P.; HAROLD, D.; JONES, L.; OWEN, M. J.; WILLIAMS, J. Alzheimer's disease genetics: Current knowledge and future challenges. **International Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 26, p. 793–802, 2011.

HOLLINGWORTH, P.; HAROLD, D.; SIMS, R.; et al. Common variants in ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. **Nat Genet**, v. 43, n. 5, p. 429–435, 2011.

HOMAYOUN, H. Parkinson Disease. **Annals of Internal Medicine**, v. 169, n. 5, p. ITC33, 2018. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1038/npg.els.0006026>>.

HOSOKAWA, M.; KLEGERIS, A.; MAGUIRE, J.; MCGEER, P. L. Expression of complement messenger RNAs and proteins by human oligodendroglial cells. **Glia**, v. 42, n. 4, p. 417–423, 2003. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/glia.10234>>.

HU, Y.; ZHAO, T.; ZANG, T.; ZHANG, Y.; CHENG, L. Identification of alzheimer's disease-related genes based on data integration method. **Frontiers in Genetics**, v. 10, n. JAN, p. 1–7, 2019.

HUANG, K. L.; MARCORA, E.; PIMENOVA, A. A.; et al. A common haplotype lowers PU.1 expression in myeloid cells and delays onset of Alzheimer's disease. **Nature Neuroscience**, v. 20, n. 8, p. 1052–1061, 2017.

HUANG, Y. M.; WANG, H.; WANG, C.; CHEN, M.; ZHAO, M. H. Promotion of hypercoagulability in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis by C5a-induced tissue factor-expressing microparticles and neutrophil extracellular traps. **Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)**, v. 67, n. 10, p. 2780–2790, 2015.

HUANG, Y.; MUCKE, L. Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. **Cell**, v.

148, n. 6, p. 1204–1222, 2012. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.040>>.

IBÁÑEZ, P.; BONNET, A. M.; DÉBARGES, B.; et al. Causal relation between α -synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. **Lancet**, v. 364, n. 9440, p. 1169–1171, 2004.

ILKIW, J.; LIMA, M. S. Perspectives for the association between olfactory disturbances and depression in Parkinson's disease. **Neural Regeneration Research**, v. 14, n. 4, p. 591, 2019.

INTERNATIONAL, A. D. **World Alzheimer Report 2019. Attitudes to dementia**. London, 2019.

IWAOKA, K.; OTSUKA, C.; MAEDA, T.; et al. Impaired metabolism of kynurenine and its metabolites in CSF of parkinson's disease. **Neuroscience Letters**, v. 714, n. October 2019, p. 134576, 2020. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.134576>>.

JACK, C. R.; LOWE, V. J.; WEIGAND, S. D.; et al. Serial PIB and MRI in normal, mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: implications for sequence of pathological events in Alzheimer's disease. **Brain**, v. 132, n. 5, p. 1355–1365, 2009..

JACQUET, M.; LACROIX, M.; ANCELET, S.; et al. Deciphering complement receptor type 1 interactions with recognition proteins of the lectin complement pathway. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 190, n. 7, p. 3721–31, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23460739>>.

JIANG, T.; SUN, Q.; CHEN, S. Oxidative stress: A major pathogenesis and potential therapeutic target of antioxidative agents in Parkinson's disease and Alzheimer's disease. **Progress in Neurobiology**, v. 147, p. 1–19, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2016.07.005>>.

JIN, C.; LI, W.; YUAN, J.; XU, W.; CHENG, Z. Association of the CR1 polymorphism with late-onset Alzheimer's disease in Chinese Han populations: A meta-analysis. **Neuroscience Letters**, v. 527, n. 1, p. 46–49, 2012. Elsevier Ireland Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22960360>>. Acesso em: 21/12/2014.

JORCH, S. K.; KUBES, P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. **Nature Medicine**, v. 23, n. 3, p. 279–287, 2017.

JURKOWSKI, T. P.; MEUSBURGER, M.; PHALKE, S.; et al. Human DNMT2 methylates tRNA^{Asp} molecules using a DNA methyltransferase-like catalytic mechanism. **Rna**, v. 14, n. 8, p. 1663–1670, 2008.

KALIA, L. V.; LANG, A. E. Parkinson's disease. **The Lancet**, v. 386, n. 9996, p. 896–912, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61393-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61393-3)>.

KAMBOH, M. I.; BARMADA, M. M.; DEMIRCI, F. Y.; et al. Genome-wide association analysis of age-at-onset in Alzheimer's disease. **Molecular psychiatry**, v. 17, n. 12, p. 1340–6, 2012.

KAPEZINSKI, F.; QUEVEDO, J.; IZQUIERDO, I. **Bases biológicas dos transtornos psiquiátricos: uma abordagem translacional**. 3.ed ed. Porto alegre: Artmed, 2011.

KARAGKOUNI, D.; PARASKEVOPOULOU, M. D.; CHATZOPOULOS, S.; et al. DIANA-TarBase v8: a decade-long collection of experimentally supported miRNA–gene interactions. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. D1, p. D239–D245, 2018. Disponível em: <<http://academic.oup.com/nar/article/46/D1/D239/4634010>>.

KARCH, C. M.; EZERSKIY, L. A.; BERTELSEN, S.; GOATE, A. M. Alzheimer's Disease Risk Polymorphisms Regulate Gene Expression in the ZCWPW1 and the CELF1 Loci. (Q. Huang, Ed.) **PLOS ONE**, v. 11, n. 2, p. e0148717, 2016. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0148717>>.

KARCH, C. M.; GOATE, A. M. Alzheimer's Disease Risk Genes and Mechanisms of Disease Pathogenesis. **Biological Psychiatry**, v. 77, n. 1, p. 43–51, 2015. Elsevier. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.05.006>>.

KATSUMATA, Y.; NELSON, P. T.; ESTUS, S.; FARDO, D. W. Translating Alzheimer's disease–associated polymorphisms into functional candidates: a survey of IGAP genes and SNPs. **Neurobiology of Aging**, v. 74, p. 135–146, 2019. Elsevier. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2018.10.017>>.

KATZ, S. Studies of Illness in the Aged - The Index of ADL: A Standardized Measure of Biological and Psychosocial Function. **JAMA**, v. 185, n. 12, p. 914, 1963.

KAUR, K.; GILL, J. S.; BANSAL, P. K.; DESHMUKH, R. Neuroinflammation - A major cause for striatal dopaminergic degeneration in Parkinson's disease. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 381, p. 308–314, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2017.08.3251>>.

KAUR, R.; MEHAN, S.; SINGH, S. Understanding multifactorial architecture of Parkinson's disease: pathophysiology to management. **Neurological Sciences**, v. 40, n. 1, p. 13–23, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10072-018-3585-x>>.

KAUT, O.; KUCHELMEISTER, K.; MOEHL, C.; WÜLLNER, U. 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine in brains of patients with multiple system atrophy and patients with Parkinson's disease. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 96, p. 41–48, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2018.12.005>>.

KELLY, J.; MOYEED, R.; CARROLL, C.; ALBANI, D.; LI, X. Gene expression meta-analysis of Parkinson's disease and its relationship with Alzheimer's disease. **Molecular Brain**, v. 12, n. 1, p. 16, 2019. Molecular Brain. Disponível em: <<https://molecularbrain.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13041-019-0436-5>>.

KEMPSTER, P. A.; HURWITZ, B.; LEES, A. J. A new look at James Parkinson's Essay on the Shaking Palsy. **Neurology**, v. 69, n. 5, p. 482–485, 2007.

KENT, W. J.; SUGNET, C. W.; FUREY, T. S.; et al. The Human Genome Browser at UCSC. **Genome Research**, v. 12, n. 6, p. 996–1006, 2002. Disponível em: <<http://www.genome.org/cgi/doi/10.1101/gr.229102>>.

KHERA, R.; DAS, N. Complement Receptor 1: Disease associations and therapeutic

implications. **Molecular Immunology**, v. 46, n. 5, p. 761–772, 2009.

KLEIN, C.; WESTENBERGER, A. Genetics of Parkinson's Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 1, p. a008888–a008888, 2012.

KLEIN, H.; JAGER, P. L. DE. Uncovering the Role of the Methylome in Dementia and Neurodegeneration. **Trends in Molecular Medicine**, v. 22, n. 8, p. 687–700, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2016.06.008>>.

KLOSKE, C. M.; WILCOCK, D. M. The Important Interface Between Apolipoprotein E and Neuroinflammation in Alzheimer's Disease. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. April, p. 1–12, 2020.

KOPP, F.; MENDELL, J. T. Functional Classification and Experimental Dissection of Long Noncoding RNAs. **Cell**, v. 172, n. 3, p. 393–407, 2018. Elsevier Inc. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.011>>.

KORCZYN, A. D.; BALASH, Y.; GUREVICH, T. Parkinson's Disease. **International Encyclopedia of Public Health**. v. 44, p.409–415, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mpmed.2016.06.001>>.

KOZOMARA, A.; BIRGAOANU, M.; GRIFFITHS-JONES, S. MiRBase: From microRNA sequences to function. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D155–D162, 2019.

KRANCE, S. H.; WU, C.-Y.; ZOU, Y.; et al. The complement cascade in Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. **Molecular Psychiatry**, 2019. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41380-019-0536-8>>.

KRETZSCHMAR, G. C.; ANTONIAZZI, A. A. H.; OLIVEIRA, L. C.; et al. First Report of CR1 Polymorphisms and Soluble CR1 Levels Associated with Late Onset Alzheimer's Disease (LOAD) in Latin America. **Journal of Molecular Neuroscience**, 2020. *Journal of Molecular Neuroscience*. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12031-020-01547-2>>.

KRETZSCHMAR, G. C.; OLIVEIRA, L. C.; NISHIHARA, R. M.; et al. Complement receptor 1 (CR1, CD35) association with susceptibility to leprosy. (K. Sankaranarayanan, Ed.) **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 8, p. e0006705, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006705>>.

KRUMAN, I. I.; CULMSEE, C.; CHAN, S. L.; et al. Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity. **Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 18, p. 6920–6926, 2000.

KRYCH-GOLDBERG, M.; ATKINSON, J. P. Structure-function relationships of complement receptor type 1. **Immunological Reviews**, v. 180, n. 1, p. 112–122, 2001. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1034/j.1600-065X.2001.1800110.x>>.

KWOK, J. B. Role of epigenetics in Alzheimer's and Parkinson's disease. **Epigenomics**, v. 2, n. 5, p. 671–682, 2010.

LAHIRI, D. K.; NUMBERGER, J. I. A rapid non-enzymatic method for the preparation

of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 19, p. 5444, 1991.

LAMBERT, J.-C.; HEATH, S.; EVEN, G.; et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. **Nature Genetics**, v. 41, n. 10, p. 1094–1099, 2009. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19734903>>.

LAMBERT, J.-C.; SORBI, S.; MATTHEWS, F.; et al. Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. **Nature Genetics**, 2013. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/24162737>>.

LANDLINGER, C.; OBERLEITNER, L.; GRUBER, P.; et al. Active immunization against complement factor C5a: A new therapeutic approach for Alzheimer's disease. **Journal of Neuroinflammation**, v. 12, n. 1, p. 1–13, 2015. Journal of Neuroinflammation. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12974-015-0369-6>>.

LANE, C. A.; HARDY, J.; SCHOTT, J. M. Alzheimer's disease. **European Journal of Neurology**, v. 25, n. 1, p. 59–70, 2018. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/ene.13439>>.

LARDENOIJE, R.; IATROU, A.; KENIS, G.; et al. The epigenetics of aging and neurodegeneration. **Progress in Neurobiology**, v. 131, p. 21–64, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.05.002>>.

LASHUEL, H. A.; OVERK, C. R.; OUESLATI, A.; MASLIAH, E. The many faces of α -synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 14, n. 1, p. 38–48, 2013. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrn3406>>.

LAU, L. M. DE; BRETHER, M. M. Epidemiology of Parkinson's disease. **The Lancet Neurology**, v. 5, n. 6, p. 525–535, 2006. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00702-017-1686-y>>.

LEE, J. D.; COULTHARD, L. G.; WOODRUFF, T. M. Complement dysregulation in the central nervous system during development and disease. **Seminars in Immunology**, v. 45, n. June, p. 101340, 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S104453231930020X>>.

LEFFLER, J.; MARTIN, M.; GULLSTRAND, B.; et al. Neutrophil Extracellular Traps That Are Not Degraded in Systemic Lupus Erythematosus Activate Complement Exacerbating the Disease. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 7, p. 3522–3531, 2012.

LEONENKO, G.; SIMS, R.; SHOAI, M.; et al. Polygenic risk and hazard scores for Alzheimer's disease prediction. **Annals of Clinical and Translational Neurology**, v. 6, n. 3, p. 456–465, 2019.

LEWITT, P. A.; LI, J.; LU, M.; et al. 3-hydroxykynurenine and other Parkinson's disease biomarkers discovered by metabolomic analysis. **Movement Disorders**, v. 28, n. 12, p. 1653–1660, 2013. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/mds.25555>>.

LI, E.; ZHANG, Y. DNA Methylation in Mammals. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 6, n. 5, p. a019133–a019133, 2014. Disponível em: <<http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a019133>>.

LI, J.-H.; LIU, S.; ZHOU, H.; QU, L.-H.; YANG, J.-H. starBase v2.0: decoding miRNA-ceRNA, miRNA-ncRNA and protein–RNA interaction networks from large-scale CLIP-Seq data. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D92–D97, 2014.

LI, J.; HAN, L.; ROEBUCK, P.; et al. TANRIC: An Interactive Open Platform to Explore the Function of lncRNAs in Cancer. **Cancer Research**, v. 75, n. 18, p. 3728–3737, 2015.

LI, Y.; SUN, H.; CHEN, Z.; et al. Implications of GABAergic Neurotransmission in Alzheimer's Disease. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 8, n. FEB, p. 31, 2016. Frontiers Media S.A. Disponível em: <www.frontiersin.org>.

LIAN, H.; LITVINCHUK, A.; CHIANG, A. C.-A.; et al. Astrocyte-Microglia Cross Talk through Complement Activation Modulates Amyloid Pathology in Mouse Models of Alzheimer's Disease. **Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 2, p. 577–589, 2016. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.2117-15.2016>>.

LIAN, H.; YANG, L.; COLE, A.; et al. NFκB-Activated Astroglial Release of Complement C3 Compromises Neuronal Morphology and Function Associated with Alzheimer's Disease. **Neuron**, v. 85, n. 1, p. 101–115, 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627314010460>>.

LIDDELOW, S. A.; GUTTENPLAN, K. A.; CLARKE, L. E.; et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. **Nature**, v. 541, n. 7638, p. 481–487, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature21029>>.

LIM, C. K.; FERNÁNDEZ-GOMEZ, F. J.; BRAIDY, N.; et al. Involvement of the kynurenine pathway in the pathogenesis of Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**, v. 155, p. 76–95, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.12.009>>.

LIMA-COSTA, M. F.; RODRIGUES, L. C.; BARRETO, M. L.; et al. Genomic ancestry and ethnoracial self-classification based on 5,871 community-dwelling Brazilians (The Epigen Initiative). **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 9812, 2015. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/srep09812>>.

LIMA, S.; KHRISTOFOROV, R.; MOMANY, C.; PHILLIPS, R. S. Crystal structure of Homo sapiens kynureninase. **Biochemistry**, v. 46, n. 10, p. 2735–2744, 2007.

LINNERTZ, C.; LUTZ, M. W.; ERVIN, J. F.; et al. The genetic contributions of SNCA and LRRK2 genes to Lewy Body pathology in Alzheimer's disease. **Human Molecular Genetics**, v. 23, n. 18, p. 4814–4821, 2014.

LITVINCHUK, A.; WAN, Y.-W.; SWARTZLANDER, D. B.; et al. Complement C3aR Inactivation Attenuates Tau Pathology and Reverses an Immune Network Deregulated in Tauopathy Models and Alzheimer's Disease. **Neuron**, v. 100, n. 6, p. 1337–1353.e5, 2018.

LIU, D.; NIU, Z.-X. The structure, genetic polymorphisms, expression and biological functions of complement receptor type 1 (CR1/CD35). **Immunopharmacology and immunotoxicology**, v. 31, n. 4, p. 524–35, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19874218>>.

LIU, X.; CHEN, J.; GUAN, T.; et al. MiRNAs and target genes in the blood as biomarkers for the early diagnosis of Parkinson's disease. **BMC Systems Biology**, v. 13, n. 1, 2019.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, p. 402–8, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609>>.

LOEFFLER, D. A.; CAMP, D. M.; BENNETT, D. A. Plaque complement activation and cognitive loss in Alzheimer's disease. **Journal of Neuroinflammation**, v. 5, p. 1–8, 2008.

LORENZ, R.; BERNHART, S. H.; HÖNER ZU SIEDERDISSEN, C.; et al. ViennaRNA Package 2.0. **Algorithms for Molecular Biology**, v. 6, n. 1, p. 26, 2011. Disponível em: <<https://almob.biomedcentral.com/articles/10.1186/1748-7188-6-26>>.

LOTHARIUS, J.; BRUNDIN, P. Pathogenesis of parkinson's disease: dopamine, vesicles and α -synuclein. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 3, n. 12, p. 932–942, 2002. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrn983>>.

LOVELACE, M. D.; VARNEY, B.; SUNDARAM, G.; et al. Recent evidence for an expanded role of the kynurenine pathway of tryptophan metabolism in neurological diseases. **Neuropharmacology**, v. 112, p. 373–388, 2017. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.03.024>>.

LU, Y.; LI, Y.; LI, G.; LU, H. Identification of potential markers for type 2 diabetes mellitus via bioinformatics analysis. **Molecular medicine reports**, v. 22, n. 3, p. 1868–1882, 2020.

LUDWIG, N.; LEIDINGER, P.; BECKER, K.; et al. Distribution of miRNA expression across human tissues. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. 8, p. 3865–3877, 2016. Oxford University Press. Disponível em: <<https://ccb-web.>>.

LUTZ, M. W.; SPRAGUE, D.; BARRERA, J.; CHIBA-FALEK, O. Shared genetic etiology underlying Alzheimer's disease and major depressive disorder. **Translational Psychiatry**, v. 10, n. 1, 2020.. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41398-020-0769-y>>.

LV, K.; GUO, Y.; ZHANG, Y.; et al. Allele-specific targeting of hsa-miR-657 to human IGF2R creates a potential mechanism underlying the association of ACAA1 insertion/deletion polymorphism with type 2 diabetes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 374, n. 1, p. 101–105, 2008. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X08012825>>.

MA, F.; ZHOU, X.; LI, Q.; et al. Effects of Folic Acid and Vitamin B12, Alone and in Combination on Cognitive Function and Inflammatory Factors in the Elderly with Mild

Cognitive Impairment: A Single-blind Experimental Design. **Current Alzheimer Research**, v. 16, n. 7, p. 622–632, 2019.

MA, L.; CAO, J.; LIU, L.; et al. LncBook: a curated knowledgebase of human long non-coding RNAs. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D128–D134, 2019. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar/article/47/D1/D128/5133669>>.

MACHIELA, M. J.; CHANOCK, S. J. LDlink: A web-based application for exploring population-specific haplotype structure and linking correlated alleles of possible functional variants. **Bioinformatics**, v. 31, n. 21, p. 3555–3557, 2015.

MADDISON, D. C.; GIORGINI, F. The kynurenine pathway and neurodegenerative disease. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 40, p. 134–141, 2015.

MAHMOUDI, R.; FELDMAN, S.; KISSERLI, A.; et al. Inherited and Acquired Decrease in Complement Receptor 1 (CR1) Density on Red Blood Cells Associated with High Levels of Soluble CR1 in Alzheimer's Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 8, p. 2175, 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1422-0067/19/8/2175>>.

MAHMOUDI, R.; KISSERLI, A.; NOVELLA, J.-L.; et al. Alzheimer's disease is associated with low density of the long CR1 isoform. **Neurobiol Aging**, v. 36, n. 4, p. 1766.e5–12, 2015.

MAITRE, M.; KLEIN, C.; PATTE-MENSAH, C.; MENSAH-NYAGAN, A.-G. Tryptophan metabolites modify brain A β peptide degradation: A role in Alzheimer's disease? **Progress in Neurobiology**, v. 190, p. 101800, 2020. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2020.101800>>.

MAJEWSKI, M.; KOZLOWSKA, A.; THOENE, M.; LEPIARCZYK, E.; GRZEGORZEWSKI, W. J. Overview of the role of vitamins and minerals on the kynurenine pathway in health and disease. **Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society**, v. 67, n. 1, p. 3–19, 2016. Disponível em: <www.jpp.krakow.pl>.

MÁNDI, Y.; VÉCSEI, L. The kynurenine system and immunoregulation. **Journal of Neural Transmission**, v. 119, n. 2, p. 197–209, 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00702-011-0681-y>>.

MARIONI, R. E.; HARRIS, S. E.; ZHANG, Q.; et al. GWAS on family history of Alzheimer's disease. **Translational Psychiatry**, v. 8, n. 1, p. 99, 2018. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41398-018-0150-6>>.

MARTIGNONI, E.; TASSORELLI, C.; NAPPI, G.; et al. Homocysteine and Parkinson's disease: A dangerous liaison? **Journal of the Neurological Sciences**, v. 257, n. 1–2, p. 31–37, 2007.

MASLIAH, E.; DUMAOP, W.; GALASKO, D.; DESPLATS, P. Distinctive patterns of DNA methylation associated with Parkinson disease: Identification of concordant epigenetic changes in brain and peripheral blood leukocytes. **Epigenetics**, v. 8, n. 10, p. 1030–1038, 2013.

MAURANO, M. T.; HUMBERT, R.; RYNES, E.; et al. Systematic Localization of Common Disease-Associated Variation in Regulatory DNA. **Science**, v. 337, n. 6099, p. 1190–1195, 2012.

MCCARTER, S. J.; STANG, C.; TURCANO, P.; et al. Higher vitamin B12 level at Parkinson's disease diagnosis is associated with lower risk of future dementia. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 73, n. March, p. 19–22, 2020. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2020.03.009>>.

MCCARTER, S. J.; TEIGEN, L. M.; MCCARTER, A. R.; et al. Low Vitamin B12 and Parkinson Disease. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 94, n. 5, p. 757–762, 2019. Mayo Foundation for Medical Education and Research. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2019.01.039>>.

MCCLEERY, J.; ABRAHAM, R. P.; DENTON, D. A.; et al. Vitamin and mineral supplementation for preventing dementia or delaying cognitive decline in people with mild cognitive impairment. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 63, n. 0, p. 713, 2018.

MCGEER, P. L.; AKIYAMA, H.; ITAGAKI, S.; MCGEER, E. G. Activation of the classical complement pathway in brain tissue of Alzheimer patients. **Neuroscience Letters**, v. 107, n. 1–3, p. 341–346, 1989.

MCGEER, P. L.; ROGERS, J.; MCGEER, E. G. Inflammation, Antiinflammatory Agents, and Alzheimer's Disease: The Last 22 Years. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 54, n. 3, p. 853–857, 2016.

MERLE, N. S.; CHURCH, S. E.; FREMEAUX-BACCHI, V.; ROUMENINA, L. T. Complement System Part I - Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. JUN, p. 1–30, 2015. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fimmu.2015.00262/abstract>>.

MIAO, Y.-R.; LIU, W.; ZHANG, Q.; GUO, A.-Y. IncRNASNP2: an updated database of functional SNPs and mutations in human and mouse lncRNAs. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. D1, p. D276–D280, 2018. Disponível em: <<http://academic.oup.com/nar/article/46/D1/D276/4564797>>.

MIGLIORE, L.; COPPEDÈ, F. Genetics, environmental factors and the emerging role of epigenetics in neurodegenerative diseases. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 667, n. 1–2, p. 82–97, 2009.

MINAKAKI, G.; MENGES, S.; KITTEL, A.; et al. Autophagy inhibition promotes SNCA/alpha-synuclein release and transfer via extracellular vesicles with a hybrid autophagosome-exosome-like phenotype. **Autophagy**, v. 14, n. 1, p. 98–119, 2018.

MINONES-MOYANO, E.; FRIEDLÄNDER, M. R.; PALLARES, J.; et al. Upregulation of a small vault RNA (svtRNA2-1a) is an early event in parkinson disease and induces neuronal dysfunction. **RNA Biology**, v. 10, n. 7, p. 1093–1106, 2013.

MIRANDA-MORALES, E.; MEIER, K.; SANDOVAL-CARRILLO, A.; et al. Implications of DNA Methylation in Parkinson's Disease. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, 2017.

MITTAL, S. **Targeting the broadly pathogenic Kynurenine pathway**. 2015.

MIYATA, T.; FAN, X. A second hit for TMA. **Blood**, v. 120, n. 6, p. 1152–1154, 2012. Disponível em: <<https://ashpublications.org/blood/article/120/6/1152/30488/A-second-hit-for-TMA>>.

MOFFETT, J. R.; NAMBOODIRI, M. A. Tryptophan and the immune response. **Immunology and Cell Biology**, v. 81, n. 4, p. 247–265, 2003.

MORENO, D. J.; RUIZ, S.; RÍOS, Á.; et al. Association of GWAS Top Genes With Late-Onset Alzheimer's Disease in Colombian Population. **American Journal of Alzheimer's Disease & Other Dementias**, v. 32, n. 1, p. 27–35, 2017. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1533317516679303>>.

MORFINI, G. A.; BURNS, M.; BINDER, L. I.; et al. Axonal Transport Defects in Neurodegenerative Diseases. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 41, p. 12776–12786, 2009.

MORGAN, A. R.; TOUCHARD, S.; LECKEY, C.; et al. Inflammatory biomarkers in Alzheimer's disease plasma. **Alzheimer's and Dementia**, v. 15, n. 6, p. 776–787, 2019.

MORGAN, B. P. Complement in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Seminars in Immunopathology**, v. 40, n. 1, p. 113–124, 2018. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00281-017-0662-9>>.

MOSCONI, L.; SORBI, S.; NACMIAS, B.; et al. Brain metabolic differences between sporadic and familial Alzheimer's disease. **Neurology**, v. 61, n. 8, p. 1138–1140, 2003.

MOULDS, J. M.; THOMAS, B. J.; DOUMBO, O.; et al. Europe PMC Funders Group Identification of the Kn a / Kn b polymorphism and a method for Knops genotyping. , v. 44, n. 2, p. 164–169, 2010.

MOULDS, J. M.; ZIMMERMAN, P. A.; DOUMBO, O. K.; et al. Molecular identification of Knops blood group polymorphisms found in long homologous region D of complement receptor 1. , v. 97, n. 9, p. 2879–2885, 2001.

MS LIMA, M.; L ANDERSEN, M.; B REKSIDLER, A.; et al. Paradoxical sleep deprivation modulates tyrosine hydroxylase expression in the nigrostriatal pathway and attenuates motor deficits induced by dopaminergic depletion. **CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)**, v. 11, n. 4, p. 359–368, 2012.

MULLER, T. Benefit of folic acid supplementation in parkinsonian patients treated with levodopa. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 74, n. 4, p. 549–549, 2003. Disponível em: <<http://jnnp.bmj.com/cgi/doi/10.1136/jnnp.74.4.549>>.

MUÑOZ, E.; OLIVA, R.; OBACH, V.; et al. Identification of Spanish familial Parkinson's disease and screening for the Ala53Thr mutation of the α -synuclein gene in early onset patients. **Neuroscience Letters**, v. 235, n. 1–2, p. 57–60, 1997.

MURRAY, L. K.; JADAVJI, N. M. The role of one-carbon metabolism and homocysteine

in Parkinson's disease onset, pathology and mechanisms. **Nutrition Research Reviews**, v. 32, n. 2, p. 218–230, 2019. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0954422419000106/type/journal_article>.

NATUNEN, T.; MARTISKAINEN, H.; SARAJÄRVI, T.; et al. Effects of NR1H3 Genetic Variation on the Expression of Liver X Receptor α and the Progression of Alzheimer's Disease. (B. Dermaut, Ed.) **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. e80700, 2013. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0080700>>.

NÉDÉLEC, Y.; SANZ, J.; BAHARIAN, G.; et al. Genetic Ancestry and Natural Selection Drive Population Differences in Immune Responses to Pathogens. **Cell**, v. 167, n. 3, p. 657- 669.e21, 2016.

NEUNER, S. M.; TCW, J.; GOATE, A. M. Genetic architecture of Alzheimer's disease. **Neurobiology of Disease**, v. 143, n. May, p. 104976, 2020. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.104976>>.

NICHOLS, E.; SZOEKE, C. E. I.; VOLLSET, S. E.; et al. Global, regional, and national burden of Alzheimer's disease and other dementias, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **The Lancet Neurology**, v. 18, n. 1, p. 88–106, 2019.

NURY, T.; LIZARD, G.; VEJUX, A. Lipids Nutrients in Parkinson and Alzheimer's Diseases: Cell Death and Cytoprotection. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 7, p. 2501, 2020. MDPI AG. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/21/7/2501>>.

NUYTEMANS, K.; MALDONADO, L.; ALI, A.; et al. Overlap between Parkinson disease and Alzheimer disease in ABCA7 functional variants. **Neurology: Genetics**, v. 2, n. 1, 2016.

OBEID, R.; SCHADT, A.; DILLMANN, U.; et al. Methylation status and neurodegenerative markers in Parkinson disease. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 10, p. 1852–1860, 2009.

OBESO, J. A; RODRIGUEZ-OROZ, M. C.; GOETZ, C. G.; et al. Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. **Nature Medicine**, v. 16, n. 6, p. 653–661, 2010. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nm.2165>>.

OFFRINGA-HUP, A. Alzheimer's disease: The derailed repair hypothesis. **Medical Hypotheses**, v. 136, n. October 2019, p. 109516, 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306987719311508>>.

OGAWA, T.; MATSON, W. R.; BEAL, M. F.; et al. Kynurenine pathway abnormalities in Parkinson's disease. **Neurology**, v. 42, n. 9, p. 1702, 1992. AAN Enterprises.

OGLE, J. D.; NOEL, J. G.; SRAMKOSKI, R. M.; OGLE, C. K.; ALEXANDER, J. W. The effects of cytokines, platelet activating factor, and arachidonate metabolites on C3B receptor (CR1, CD35) expression and phagocytosis by neutrophils. **Cytokine**, v. 2, n. 6, p. 447–455, 1990.

OHNMACHT, J.; MAY, P.; SINKKONEN, L.; KRÜGER, R. Missing heritability in Parkinson's disease: the emerging role of non-coding genetic variation. **Journal of Neural Transmission**, v. 127, n. 5, p. 729–748, 2020. Springer Vienna. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00702-020-02184-0>>.

OKUDA, S.; NISHIYAMA, N.; SAITO, H.; KATSUKI, H. 3-Hydroxykynurenine, an Endogenous Oxidative Stress Generator, Causes Neuronal Cell Death with Apoptotic Features and Region Selectivity. **Journal of Neurochemistry**, v. 70, n. 1, p. 299–307, 1998. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1471-4159.1998.70010299.x>>.

OLNEY, J. W.; LABRUYERE, J.; WANG, G.; et al. NMDA antagonist neurotoxicity: Mechanism and prevention. **Science**, v. 254, n. 5037, p. 1515–1518, 1991.

OVALATH, S.; DEEPA, P. The history of parkinsonism: Descriptions in ancient Indian medical literature. **Movement Disorders**, v. 28, n. 5, p. 566–568, 2013.

PALA, E.; DENKÇEKEN, T. Evaluation of miRNA Expression Profiles in Schizophrenia Using Principal-Component Analysis-Based Unsupervised Feature Extraction Method. **Journal of computational biology: a journal of computational molecular cell biology**, v. 27, n. 8, p. 1253–1263, 2020.

PALMER, L. J.; DAMGAARD, C.; HOLMSTRUP, P.; NIELSEN, C. H. Influence of complement on neutrophil extracellular trap release induced by bacteria. **Journal of Periodontal Research**, v. 51, n. 1, p. 70–76, 2016.

PALS, P.; LINCOLN, S.; MANNING, J.; et al. α -Synuclein promoter confers susceptibility to Parkinson's disease. **Annals of Neurology**, v. 56, n. 4, p. 591–595, 2004.

PAPATHEODOROU, I.; MORENO, P.; MANNING, J.; et al. Expression Atlas update: From tissues to single cells. **Nucleic Acids Research**, v. 48, n. D1, p. D77–D83, 2020.

PARASKEVOPOULOU, M. D.; VLACHOS, I. S.; KARAGKOUNI, D.; et al. DIANA-LncBase v2: indexing microRNA targets on non-coding transcripts. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D231–D238, 2016. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkv1270>>.

PARK, J.-S.; DAVIS, R. L.; SUE, C. M. Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease: New Mechanistic Insights and Therapeutic Perspectives. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v. 18, n. 5, p. 21, 2018. Current Neurology and Neuroscience Reports. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11910-018-0829-3>>.

PASCUAL, M.; LUTZ, H. U.; STEIGER, G.; STAMMLER, P.; SCHIFFERLI, J. A. Release of vesicles enriched in complement receptor 1 from human erythrocytes. **The Journal of Immunology**, v. 151, n. 1, p. 397–404, 1993.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates - The New Coronal Set. , p. 209, 2004.

PFEFFER, R. I.; KUROSAKI, T. T.; HARRAH, C. H.; CHANCE, J. M.; FILOS, S. Measurement of Functional Activities in Older Adults in the Community. **Journal of**

Gerontology, v. 37, n. 3, p. 323–329, 1982.

PHILLIPS, R. S. Structure and mechanism of kynureninase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 544, p. 69–74, 2014. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2013.10.020>>.

PIEPER, H. C.; EVERT, B. O.; KAUT, O.; et al. Different methylation of the TNF-alpha promoter in cortex and substantia nigra: Implications for selective neuronal vulnerability. **Neurobiology of Disease**, v. 32, n. 3, p. 521–527, 2008. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2008.09.010>>.

PIETRONIGRO, E. C.; BIANCA, V. DELLA; ZENARO, E.; CONSTANTIN, G. NETosis in Alzheimer's Disease. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. MAR, 2017. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.00211/full>>.

PIÑERO, J.; BRAVO, À.; QUERALT-ROSINACH, N.; et al. DisGeNET: a comprehensive platform integrating information on human disease-associated genes and variants. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D833–D839, 2017. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkw943>>.

POLYMEROPOULOS, M. H.; HIGGINS, J. J.; GOLBE, L. I.; et al. Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. **Science**, v. 274, n. 5290, p. 1197–1199, 1996.

POLYMEROPOULOS, M. H.; LAVEDAN, C.; LEROY, E.; et al. Mutation in the α -Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson's Disease. **Science**, v. 276, n. June, p. 2045–2047, 1997.

PORTELA, A.; ESTELLER, M. Epigenetic modifications and human disease. **Nature biotechnology**, v. 28, n. 10, p. 1057–1068, 2010. Nature Publishing Group.

PRESUMEY, J.; BIALAS, A. R.; CARROLL, M. C. **Complement System in Neural Synapse Elimination in Development and Disease**. 1st ed. Elsevier Inc., 2017.

PRINCE, M.; BRYCE, R.; ALBANESE, E.; et al. The global prevalence of dementia: A systematic review and metaanalysis. **Alzheimer's & Dementia**, v. 9, n. 1, p. 63–75.e2, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jalz.2012.11.007>>.

PRUCHNIAK, M. P.; OSTAFIN, M.; WACHOWSKA, M.; et al. Neutrophil extracellular traps generation and degradation in patients with granulomatosis with polyangiitis and systemic lupus erythematosus. **Autoimmunity**, v. 52, n. 3, p. 126–135, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/08916934.2019.1631812>>.

QUERFURTH, H. W.; LAFERLA, F. M. Alzheimer's Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 4, p. 329–344, 2010. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra0909142>>.

QURESHI, G.; QURESHI, A.; DEVRAJANI, B.; CHIPPA, M.; SYED, S. Is the Deficiency of Vitamin B12 Related to Oxidative Stress and Neurotoxicity in Parkinsons Patients? **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 7, n. 1, p. 20–27, 2008.

R DEVELOPMENT CORE TEAM, R. R: A Language and Environment for Statistical

Computing. (R. D. C. Team, Ed.) **R Foundation for Statistical Computing**, R Foundation for Statistical Computing., 2011. R Foundation for Statistical Computing.

RAJDA, C.; BERGQUIST, J.; VÉCSEI, L. Kynurenines, redox disturbances and neurodegeneration in multiple sclerosis. **Journal of Neural Transmission, Supplementa**, , n. 72, p. 323–329, 2007.

RAJPUT, A. H.; ROZDILSKY, B.; RAJPUT, A. Alzheimer's Disease and Idiopathic Parkinson's Disease Coexistence. **Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology**, v. 6, n. 3, p. 170–176, 1993.

RAMASAMY, A.; TRABZUNI, D.; GUELFY, S.; et al. Genetic variability in the regulation of gene expression in ten regions of the human brain. **Nature Neuroscience**, v. 17, n. 10, p. 1418–1428, 2014. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nn.3801>>.

REGNIER, F. E.; KIM, J. Proteins and Proteoforms: New Separation Challenges. **Analytical Chemistry**, v. 90, n. 1, p. 361–373, 2018. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.7b05007>>.

REITZ, C. Alzheimer's Disease and the Amyloid Cascade Hypothesis: A Critical Review. **International Journal of Alzheimer's Disease**, v. 2012, p. 1–11, 2012. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ijad/2012/369808/>>.

REMONDELLI, P.; RENNA, M. The Endoplasmic Reticulum Unfolded Protein Response in Neurodegenerative Disorders and Its Potential Therapeutic Significance. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 10, n. June, p. 1–16, 2017. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnmol.2017.00187/full>>.

RENANI, P. G.; TAHERI, F.; ROSTAMI, D.; et al. Involvement of aberrant regulation of epigenetic mechanisms in the pathogenesis of Parkinson's disease and epigenetic-based therapies. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 11, p. 19307–19319, 2019.

REY-CAMPOS, J.; RUBINSTEIN, P. A Physical Map Of The Human Regulator Of Complement Activation Gene Cluster Linking The Complement Genes CR1, CR2, DAF, and C4BP. v. 167, p. 664–669, 1988.

REYES OCAMPO, J.; LUGO HUITRÓN, R.; GONZÁLEZ-ESQUIVEL, D.; et al. Kynurenines with neuroactive and redox properties: Relevance to aging and brain diseases. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, 2014.

RHEAD, B.; KAROLCHIK, D.; KUHN, R. M.; et al. The UCSC Genome Browser database: update 2010. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. Database, p. D613–D619, 2010. Disponível em: <<http://nar.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/nar/gkp939>>.

RICKLIN, D.; HAJISHENGALLIS, G.; YANG, K.; LAMBRIS, J. D. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. **Nature Immunology**, v. 11, n. 9, p. 785–797, 2010. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ni.1923>>.

RICKLIN, D.; REIS, E. S.; LAMBRIS, J. D. Complement in disease: a defence system

turning offensive. **Nature Reviews Nephrology**, v. 12, n. 7, p. 383–401, 2016. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrneph.2016.70>> .

RINN, J. L.; CHANG, H. Y. Genome Regulation by Long Noncoding RNAs. **Annual Review of Biochemistry**, v. 81, n. 1, p. 145–166, 2012. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-biochem-051410-092902>>.

ROBERSON, E. D. O.; LIU, Y.; RYAN, C.; et al. A Subset of Methylated CpG Sites Differentiate Psoriatic from Normal Skin - Suppl. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 3, p. 583–592, 2012. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X15356402>>.

ROCKMAN, M. V.; KRUGLYAK, L. Genetics of global gene expression. **Nature Reviews Genetics**, v. 7, n. 11, p. 862–872, 2006. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrg1964>>.

RODRIGUEZ-RIUS, A.; LOPEZ, S.; MARTINEZ-PEREZ, A.; SOUTO, J. C.; SORIA, J. M. Identification of a Plasma MicroRNA Profile Associated with Venous Thrombosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, p. 1392–1399, 2020.

ROGERS, J.; COOPER, N. R.; WEBSTER, S.; et al. Complement activation by β -amyloid in Alzheimer disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 21, p. 10016–10020, 1992.

ROSSI, B.; CONSTANTIN, G.; ZENARO, E. The emerging role of neutrophils in neurodegeneration. **Immunobiology**, v. 225, n. 1, p. 151865, 2020. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.imbio.2019.10.014>>.

RYU, S.; ATZMON, G.; BARZILAI, N.; RAGHAVACHARI, N.; SUH, Y. Genetic landscape of APOE in human longevity revealed by high-throughput sequencing. **Mechanisms of Ageing and Development**, 2016.

SALVIANO-SILVA, A.; LOBO-ALVES, S. C.; ALMEIDA, R. C. DE; MALHEIROS, D.; PETZL-ERLER, M. L. Besides pathology: Long non-coding RNA in cell and tissue homeostasis. **Non-coding RNA**, v. 4, n. 1, p. 1–37, 2018.

SAMBANDAM, T.; CHATHAM, W. W. Ligation of CR1 attenuates Fc receptor-mediated myeloperoxidase release and HOCl production by neutrophils. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 63, n. 4, p. 477–485, 1998.

SANTOS-REBOUÇAS, C. B.; GONÇALVES, A. P.; SANTOS, J. M. DOS; et al. rs3851179 Polymorphism at 5' to the PICALM Gene is Associated with Alzheimer and Parkinson Diseases in Brazilian Population. **NeuroMolecular Medicine**, v. 19, n. 2–3, p. 293–299, 2017.

SANTOS, L. R. DOS; PIMASSONI, L. H. S.; SENA, G. G. S.; et al. Validating GWAS Variants from Microglial Genes Implicated in Alzheimer's Disease. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 62, n. 2, p. 215–221, 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12031-017-0928-7>>.

SARTORI, M.; MENDES, T.; DESAI, S.; et al. BIN1 recovers tauopathy-induced long-term memory deficits in mice and interacts with Tau through Thr348 phosphorylation.

Acta Neuropathologica, v. 138, n. 4, p. 631–652, 2019. Springer Berlin Heidelberg. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00401-019-02017-9>>.

SHELLENBERG, G. D.; MONTINE, T. J. The Genetics and Neuropathology of Alzheimer's Disease. **Acta Neuropathologica**, v. 124, n. 3, p. 305–323, 2012.

SCHEPPINGEN, J. VAN; MILLS, J. D.; ZIMMER, T. S.; et al. miR147b: A novel key regulator of interleukin 1 beta-mediated inflammation in human astrocytes. **Glia**, v. 66, n. 5, p. 1082–1097, 2018.

SCHONROCK, N.; MATAMALES, M.; ITTNER, L. M.; GÖTZ, J. MicroRNA networks surrounding APP and amyloid- β metabolism - Implications for Alzheimer's disease. **Experimental Neurology**, v. 235, n. 2, p. 447–454, 2012. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.11.013>>.

SCHWARCZ, R.; BRUNO, J. P.; MUCHOWSKI, P. J.; WU, H.-Q. Kynurenines in the mammalian brain: when physiology meets pathology. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 13, n. 7, p. 465–477, 2012. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrn3257>>.

SCHWARCZ, R.; STONE, T. W. The kynurenine pathway and the brain: Challenges, controversies and promises. **Neuropharmacology**, v. 112, p. 237–247, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.08.003>>.

SCOTT, W. K.; YAMAOKA, L. H.; STAJICH, J. M.; et al. The α -synuclein gene is not a major risk factor in familial Parkinson disease. **Neurogenetics**, v. 2, n. 3, p. 191–192, 1999.

SEN, S.; WEST, A. B. The Therapeutic Potential of LRRK2 and α -Synuclein in Parkinson's Disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n. 9, p. 2167–2187, 2009. Disponível em: <<http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ars.2009.2430>>.

SENGELØV, H.; KJELDSEN, L.; KROEZE, W.; BERGER, M.; BORREGAARD, N. Secretory vesicles are the intracellular reservoir of complement receptor 1 in human neutrophils. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 153, n. 2, p. 804–10, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8021514>>.

SHEN, Y.; LUE, L. F.; YANG, L. B.; et al. Complement activation by neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v. 305, n. 3, p. 165–168, 2001.

SHEPARD, P. D.; JOY, B.; CLERKIN, L.; SCHWARCZ, R. Micromolar brain levels of kynurenic acid are associated with a disruption of auditory sensory gating in the rat. **Neuropsychopharmacology**, v. 28, n. 8, p. 1454–1462, 2003.

SHI, H.; ENRIQUEZ, A.; RAPADAS, M.; et al. NAD deficiency, congenital malformations, and niacin supplementation. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 6, p. 544–552, 2017.

SIMÓN-SÁNCHEZ, J.; SCHULTE, C.; BRAS, J. M.; et al. Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. **Nature genetics**, v. 41, n. 12, p. 1308–12, 2009.

SIMON, D. K.; TANNER, C. M.; BRUNDIN, P. Parkinson Disease Epidemiology, Pathology, Genetics, and Pathophysiology. **Clinics in Geriatric Medicine**, v. 36, n. 1, p. 1–12, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cger.2019.08.002>>.

SISODIA, S. S.; ST GEORGE-HYSLOP, P. H. γ -Secretase, notch, A β and alzheimer's disease: Where do the presenilins fit in? **Nature Reviews Neuroscience**, v. 3, n. 4, p. 281–290, 2002.

SMALHEISER, N. R. Mining Clinical Case Reports to Identify New Lines of Investigation in Alzheimer's Disease: The Curious Case of DNase I. **Journal of Alzheimer's Disease Reports**, v. 3, n. 1, p. 71–76, 2019.

SMITH, M. D. A. C. Doença de Alzheimer. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 21, p. 3–7, 1999.

SOERENSEN, M.; DATO, S.; TAN, Q.; et al. Evidence from case-control and longitudinal studies supports associations of genetic variation in APOE, CETP, and IL6 with human longevity. **Age**, 2013.

SONG, H.; PARK, H.; KIM, Y. S.; et al. L-Kynurenine-induced apoptosis in human NK cells is mediated by reactive oxygen species. **International Immunopharmacology**, v. 11, n. 8, p. 932–938, 2011. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2011.02.005>>.

SOUSA, A. A. DE; BRAGA, S. A.; SOBRINHO, H. M. DA R. Neuroinflamação na doença de Parkinson. **Estudos**, v. 43, n. 1, p. 79, 2016. Disponível em: <<http://seer.pucgoias.edu.br/index.php/estudos/article/view/5188>>.

STEINER, J. A.; QUANSAH, E.; BRUNDIN, P. The concept of alpha-synuclein as a prion-like protein: ten years after. **Cell and Tissue Research**, v. 373, n. 1, p. 161–173, 2018. *Cell and Tissue Research*. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00441-018-2814-1>>.

STOKER, T. B.; GREENLAND, J. C. **Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects**. Brisbane, Australia: Codon Publications, 2018.

STOLTZNER, S. E.; GRENFELL, T. J.; MORI, C.; et al. Temporal Accrual of Complement Proteins in Amyloid Plaques in Down's Syndrome with Alzheimer's Disease. **The American Journal of Pathology**, v. 156, n. 2, p. 489–499, 2000. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002944010647530>>.

STROOPER, B. DE; KARRAN, E. The Cellular Phase of Alzheimer's Disease. **Cell**, v. 164, n. 4, p. 603–615, 2016. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.056>>.

SU, X.; CHU, Y.; KORDOWER, J. H.; et al. PGC-1 α Promoter Methylation in Parkinson's Disease. (T. M. Dawson, Ed.) **PLOS ONE**, v. 10, n. 8, p. e0134087, 2015. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0134087>>.

SUN, R.; YANG, S.; ZHENG, B.; LIU, J.; MA, X. Apolipoprotein E Polymorphisms and Parkinson Disease With or Without Dementia: A Meta-Analysis Including 6453 Participants. **Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology**, v. 32, n. 1, p. 3–15,

2019.

SWEENEY, B. A.; PETROV, A. I.; BURKOV, B.; et al. RNAcentral: a hub of information for non-coding RNA sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D221–D229, 2019.

SZKLARCZYK, D.; GABLE, A. L.; LYON, D.; et al. STRING v11: protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D607–D613, 2019.

TAN, L.; YU, J.-T.; HU, N.; TAN, LAN. Non-coding RNAs in Alzheimer's Disease. **Molecular Neurobiology**, v. 47, n. 1, p. 382–393, 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12035-012-8359-5>>.

TAN, LIN; YU, J.-T.; TAN, LAN. The kynurenine pathway in neurodegenerative diseases: Mechanistic and therapeutic considerations. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 323, n. 1–2, p. 1–8, 2012. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2012.08.005>>.

TAN, M.-S.; YU, J.-T.; TAN, L. Bridging integrator 1 (BIN1): form, function, and Alzheimer's disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 19, n. 10, p. 594–603, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2013.06.004>>.

TARGA, A. D. S.; NOSEDA, A. C. D.; RODRIGUES, L. S.; AURICH, M. F.; LIMA, M. M. S. REM sleep deprivation and dopaminergic D2 receptors modulation increase recognition memory in an animal model of Parkinson's disease. **Behavioural Brain Research**, v. 339, p. 239–248, 2018. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2017.11.008>>.

TARGA, A. D. S.; RODRIGUES, L. S.; NOSEDA, A. C. D.; et al. Unraveling a new circuitry for sleep regulation in Parkinson's disease. **Neuropharmacology**, v. 108, p. 161–171, 2016.

TARKOWSKI, E. Intrathecal inflammation precedes development of Alzheimer's disease. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 74, n. 9, p. 1200–1205, 2003.

TENNER, A. J. Complement-Mediated Events in Alzheimer's Disease: Mechanisms and Potential Therapeutic Targets. **The Journal of Immunology**, v. 204, n. 2, p. 306–315, 2020.

TENNER, A. J.; STEVENS, B.; WOODRUFF, T. M. New tricks for an ancient system: Physiological and pathological roles of complement in the CNS. **Molecular Immunology**, v. 102, n. May, p. 3–13, 2018.

TETZ, V.; TETZ, G. Effect of deoxyribonuclease I treatment for dementia in end-stage Alzheimer's disease: a case report. **Journal of Medical Case Reports**, v. 10, n. 1, p. 131, 2016.

THOMAS, B.; MATSON, S.; CHOPRA, V.; et al. A novel method for detecting 7-methyl guanine reveals aberrant methylation levels in Huntington disease. **Analytical**

Biochemistry, v. 436, n. 2, p. 112–120, 2013. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2013.01.035>>.

THOMAS, S.; HOXHA, K.; TRAN, A.; PRENDERGAST, G. C. Bin1 antibody lowers the expression of phosphorylated Tau in Alzheimer's disease. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 120, n. 10, p. 18320–18331, 2019.

THONBERG, H.; CHIANG, H. H.; LILIUS, L.; et al. Identification and description of three families with familial Alzheimer disease that segregate variants in the SORL1 gene. **Acta neuropathologica communications**, 2017.

TOLLEFSBOL, T. **Handbook of Epigenetics: The New Molecular and Medical Genetics**. Elsevier, 2011.

TÖRÖK, K.; DEZSŐ, B.; BENCSIK, A.; UZONYI, B.; ERDEI, A. Complement receptor type 1 (CR1/CD35) expressed on activated human CD4+ T cells contributes to generation of regulatory T cells. **Immunology Letters**, v. 164, p. 117–124, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165247815000267>>.

TREDICI, K. DEL; BRAAK, H. Lewy pathology and neurodegeneration in premotor Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 27, n. 5, p. 597–607, 2012. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/mds.24921>>.

UHLÉN, M.; FAGERBERG, L.; HALLSTRÖM, B.; et al. Tissue-based map of the human proteome. **Science**, v. 347, p. 1260419, 2015.

UNNIKRISHNAN, A.; FREEMAN, W. M.; JACKSON, J.; et al. The role of DNA methylation in epigenetics of aging. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 195, p. 172–185, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.11.001>>.

URDINGUIO, R. G.; SANCHEZ-MUT, J. V.; ESTELLER, M. Epigenetic mechanisms in neurological diseases: genes, syndromes, and therapies. **The Lancet Neurology**, v. 8, n. 11, p. 1056–1072, 2009. Elsevier Ltd. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70262-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70262-5)>.

VÉCSEI, L.; SZALÁRDY, L.; FÜLÖP, F.; TOLDI, J. Kynurenines in the CNS: recent advances and new questions. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, n. 1, p. 64–82, 2013. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrd3793>>.

VEERHUIS, R.; NIELSEN, H. M.; TENNER, A. J. Complement in the brain. **Molecular Immunology**, v. 48, n. 14, p. 1592–1603, 2011.

VELDHUISEN, B.; LIGTHART, P. C.; VIDARSSON, G.; et al. Molecular analysis of the York antigen of the Knops blood group system. **Transfusion**, v. 51, n. 7, p. 1389–96, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21214579>>.

VLACHOS, I. S.; ZAGGANAS, K.; PARASKEVOPOULOU, M. D.; et al. DIANA-miRPath v3.0: deciphering microRNA function with experimental support. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. W1, p. W460–W466, 2015. Disponível em: <<http://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkv403>>.

VOLDERS, P.-J.; ANCKAERT, J.; VERHEGGEN, K.; et al. LNCipedia 5: towards a

reference set of human long non-coding RNAs. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D135–D139, 2019. Oxford University Press. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar/article/47/D1/D135/5146198>>.

WADDINGTON, C. H. The epigenotype. 1942. **International journal of epidemiology**, v. 41, n. 1, p. 10–13, 2012.

WALSH, D. M.; SELKOE, D. J. Deciphering the Molecular Basis of Memory Failure in Alzheimer's Disease. **Neuron**, v. 44, n. 1, p. 181–193, 2004. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627304006038>>.

WANG, K. C.; CHANG, H. Y. Molecular Mechanisms of Long Noncoding RNAs. **Molecular Cell**, v. 43, n. 6, p. 904–914, 2011. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2011.08.018>>.

WANG, L.; XIONG, N.; HUANG, J.; et al. Protein-Restricted Diets for Ameliorating Motor Fluctuations in Parkinson's Disease. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 9, 2017.

WANG, L.; ZENG, L.; JIANG, H.; LI, Z.; LIU, R. Microarray profile of long noncoding RNA and messenger RNA expression in a model of Alzheimer's disease. **Life**, v. 10, n. 5, p. 1–19, 2020.

WEBSTER, S.; BRADT, B.; ROGERS, J.; COOPER, N. Aggregation State-Dependent Activation of the Classical Complement Pathway by the Amyloid β Peptide. **Journal of Neurochemistry**, v. 69, n. 1, p. 388–398, 1997. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1471-4159.1997.69010388.x>>.

WHITTINGTON, R. A.; PLANEL, E.; TERRANDO, N. Impaired resolution of inflammation in Alzheimer's disease: A review. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. NOV, p. 1–9, 2017.

WŁODAREK, D. Role of Ketogenic Diets in Neurodegenerative Diseases (Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease). **Nutrients**, v. 11, n. 1, p. 169, 2019. MDPI AG. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2072-6643/11/1/169>>.

WONG, B. Y. W. W.; KENNEDY, C. A.; BONACCIO, E. T.; et al. ANALYSIS OF MULTIPLE RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISMS OF THE GENE FOR THE HUMAN COMPLEMENT RECEPTOR TYPE I Duplication of Genomic Sequences Occurs in Association with a High Molecular Mass Receptor Allotype. **J. Exp. Med.**, v. 164, n. November, p. 1531–1546, 1986.

WU, Y.-Y.; KUO, H.-C. Functional roles and networks of non-coding RNAs in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. **Journal of Biomedical Science**, v. 27, n. 1, p. 49, 2020. Journal of Biomedical Science. Disponível em: <<https://jbiomedsci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12929-020-00636-z>>.

WÜLLNER, U.; KAUT, O.; DEBONI, L.; PISTON, D.; SCHMITT, I. DNA methylation in Parkinson's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 139, p. 108–120, 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/jnc.13646>>.

WYSS-CORAY, T.; ROGERS, J. Inflammation in Alzheimer Disease--A Brief Review

of the Basic Science and Clinical Literature. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 1, p. a006346–a006346, 2012. Disponível em: <<http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a006346>>.

XIE, A.; GAO, J.; XU, L.; MENG, D. Shared Mechanisms of Neurodegeneration in Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–8, 2014. Hindawi Publishing Corporation. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/648740/>>.

XIE, C.; YUAN, J.; LI, H.; et al. NONCODEv4: exploring the world of long non-coding RNA genes. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D98–D103, 2014. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkt1222>>.

XIE, Y.; FENG, H.; PENG, S.; XIAO, J.; ZHANG, J. Association of plasma homocysteine, vitamin B12 and folate levels with cognitive function in Parkinson's disease: A meta-analysis. **Neuroscience Letters**, v. 636, p. 190–195, 2017. Elsevier Ireland Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2016.11.007>>.

XU, Z.; LI, H.; JIN, P. Epigenetics-Based Therapeutics for Neurodegenerative Disorders. **Current Geriatrics Reports**, v. 1, n. 4, p. 229–236, 2012.

YAMAZAKI, Y.; ZHAO, N.; CAULFIELD, T. R.; LIU, C.-C.; BU, G. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: pathobiology and targeting strategies. **Nature Reviews Neurology**, 2019.

YATES, A. D.; ACHUTHAN, P.; AKANNI, W.; et al. Ensembl 2020. **Nucleic Acids Research**, v. 48, n. D1, p. D682–D688, 2019. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar/advance-article/doi/10.1093/nar/gkz966/5613682>>.

YIN, F.; SANCHETI, H.; PATIL, I.; CADENAS, E. Energy metabolism and inflammation in brain aging and Alzheimer's disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 100, p. 108–122, 2016.

YOUSEFI, S.; MIHALACHE, C.; KOZLOWSKI, E.; SCHMID, I.; SIMON, H. U. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. **Cell Death and Differentiation**, v. 16, n. 11, p. 1438–1444, 2009. Nature Publishing Group.

YU, J.-T.; TAN, L.; HARDY, J. Apolipoprotein E in Alzheimer's Disease: An Update. **Annual Review of Neuroscience**, v. 37, n. 1, p. 79–100, 2014. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-neuro-071013-014300>>.

YUEN, J.; PLUTHERO, F. G.; DOUDA, D. N.; et al. NETosing neutrophils activate complement both on their own NETs and bacteria via alternative and non-alternative pathways. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. APR, p. 1–14, 2016.

ZENARO, E.; PIETRONIGRO, E.; BIANCA, V. DELLA; et al. Neutrophils promote Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline via LFA-1 integrin. **Nature Medicine**, v. 21, n. 8, p. 880–886, 2015.

ZESIEWICZ, T. A. Parkinson Disease. **CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology**, v. 25, n. 4, p. 896–918, 2019.

ZHANG, C.; PIERCE, B. L. Genetic susceptibility to accelerated cognitive decline in the US Health and Retirement Study. **Neurobiology of Aging**, 2014.

ZHANG, W.; YAO, G.; WANG, JIANBO; et al. ncRPheno: a comprehensive database platform for identification and validation of disease related noncoding RNAs. **RNA Biology**, v. 17, n. 7, p. 943–955, 2020. Taylor & Francis. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/15476286.2020.1737441>>.

ZHANG, Y.; SHEN, J.; HE, X.; et al. A Rare Variant at the KYNU Gene Is Associated With Kynureninase Activity and Essential Hypertension in the Han Chinese Population. **Circulation: Cardiovascular Genetics**, v. 4, n. 6, p. 687–694, 2011.

ZHU, X.-C.; CAO, L.; TAN, M.-S.; et al. Association of Parkinson's Disease GWAS-Linked Loci with Alzheimer's Disease in Han Chinese. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 1, p. 308–318, 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12035-015-9649-5>>.

ZHU, X. C.; YU, J. T.; JIANG, T.; et al. CR1 in Alzheimer's Disease. **Molecular Neurobiology**, v. 51, n. 2, p. 753–765, 2015.

ZHU, Z.; LIN, Y.; LI, X.; DRIVER, J. A.; LIANG, L. Shared genetic architecture between metabolic traits and Alzheimer's disease: a large-scale genome-wide cross-trait analysis. **Human Genetics**, v. 138, n. 3, p. 271–285, 2019. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00439-019-01988-9>>.

ZHU, Z.; YANG, Y.; XIAO, Z.; et al. TOMM40 and APOE variants synergistically increase the risk of Alzheimer's disease in a Chinese population. **Aging Clinical and Experimental Research**, , n. 0123456789, 2020. Springer International Publishing. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s40520-020-01661-6>>.

ZHU, Z.; ZHANG, F.; HU, H.; et al. Integration of summary data from GWAS and eQTL studies predicts complex trait gene targets. **Nature Genetics**, 2016.

ZINGER, A.; BARCIA, C.; HERRERO, M. T.; GUILLEMIN, G. J. The Involvement of Neuroinflammation and Kynurenine Pathway in Parkinson's Disease. **Parkinson's Disease**, v. 2011, p. 1–11, 2011. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/pd/2011/716859/>>.

ZLOKOVIC, B. V. Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 12, n. 12, p. 723–738, 2011. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrn3114>>.

ZLOTORYNSKI, E. Histone serotonylation boosts neuronal transcription. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 20, n. 6, p. 323–323, 2019. Springer US. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41580-019-0124-4>>.

ZWILLING, D.; HUANG, S. Y.; SATHYASAIKUMAR, K. V.; et al. Kynurenine 3-monooxygenase inhibition in blood ameliorates neurodegeneration. **Cell**, v. 145, n. 6, p. 863–874, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.05.020>>.

APÊNDICE 1 – COMITÊ DE ÉTICA – AMOSTRAS DE ALZHEIMER

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - SETOR DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo de polimorfismos associados a doenças neurodegenerativas

Pesquisador: Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 4

CAAE: 55965316.1.0000.0102

Instituição Proponente: Programa de Pós-Graduação em Genética

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.738.030

Apresentação do Projeto:

Estudo de polimorfismos associados a doenças neurodegenerativas.

Pesquisador Responsável: Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza; colaboradores: Vanessa Ribeiro dos Santos, Angela Adriane Hanel Antoniazzi, Carla Daniela Sulzbach, Angélica B. W. Boldt, Lupe Furtado Alle. OS autores citam no corpo do trabalho Alzheimer e Doença por Corpos de Lewy como os alvos do estudo. Os participantes serão 500 voluntários todos com idade superior a 60 anos, divididos em dois grupos: o grupo estudo e o grupo controle(saudáveis). Projeto tem como coparticipantes o Centro de Especialidades Médicas de São José dos Pinhais e Gran Ville Senior Center, Pilarzinho, Curitiba, Pr.

Os participantes da pesquisa serão abordados de forma direta na sala de espera pelo atendimento.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral: Estudar mecanismos genéticos associados a doenças neurodegenerativas demenciais.

Objetivos Específicos:

Avaliar se existe associação entre polimorfismos da família gênica ABC e doenças neurodegenerativas demenciais.

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - Térreo

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.080-240

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3380-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - SETOR DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -



Continuação do Parecer: 1.738.030

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Avaliar se existe associação entre polimorfismos de genes relacionados ao processo inflamatório e doenças neurodegenerativas demenciais.

Avaliar a expressão dos genes estudados em casos e controles e entre as diferentes demências.

Verificar se esses polimorfismos podem ser utilizados para auxiliar no diagnóstico precoce e/ou diagnóstico diferencial entre as diferentes demências estudadas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Segundo os autores: "Este projeto de pesquisa prevê para os indivíduos participantes, além do desconforto, riscos mínimos inerentes à punção venosa, como edemas. Os participantes serão orientados quanto a estes riscos, recebendo instruções detalhadas de como proceder após a coleta. Para os pesquisadores, os riscos serão minimizados pelo emprego de normas e procedimentos de segurança aplicados aos laboratórios do Programa de Pós-Graduação em Genética e do domínio da metodologia empregada. Este projeto também não causará impacto ao meio ambiente. Os materiais utilizados no projeto serão armazenados, lavados e/ou descartados seguindo as normas vigentes de biossegurança e proteção ao meio ambiente." "Como principal benefício tem-se a identificação de genes associados a doenças neurodegenerativas demenciais. O estudo desta associação pode auxiliar no desenvolvimento de meios de prevenção ou tratamento para este grupo de doenças evitando que pessoas afetadas tenham redução do tempo ou qualidade de vida".

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos foram anexados

Recomendações:

Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais e final, sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos, através da Plataforma Brasil - no modo: NOTIFICAÇÃO. Demais alterações e prorrogação de prazo devem ser enviadas no modo EMENDA. Lembrando que o cronograma de execução da pesquisa deve ser atualizado no sistema Plataforma Brasil antes de enviar solicitação de prorrogação de prazo.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendências atendidas.

- É obrigatório retirar na secretaria do CEP/SD uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido com carimbo onde constará data de aprovação por este CEP/SD, sendo este modelo

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - Térreo

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.060-240

UF: PR Município: CURITIBA

Telefone: (41)3380-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - SETOR DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -



Continuação do Parecer: 1.738.030

reproduzido para aplicar junto ao participante da pesquisa.

O TCLE deverá conter duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma cópia ficará com o participante da pesquisa (Carta Circular nº. 003/2011CONEP/CNS).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_693612.pdf	31/08/2016 11:24:50		Aceito
Outros	respostas_d.pdf	31/08/2016 11:24:20	Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_diagnosticoPATER_d.docx	31/08/2016 11:24:03	Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_diagnosticoGARDENVILLE_d.docx	31/08/2016 11:23:50	Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_controlePATER_d.docx	31/08/2016 11:23:29	Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_controleGARDENVILLE_d.docx	31/08/2016 11:23:13	Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza	Aceito
Outros	respostas_2.pdf	26/07/2016 15:25:52	Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_controleGARDENVILLE_c.docx	26/07/2016 15:25:27	Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_controlePATER_c.docx	26/07/2016 15:25:15	Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_diagnosticoGARDENVILLE_c.docx	26/07/2016 15:25:01	Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza	Aceito

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - Térreo

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.060-240

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3380-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - SETOR DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -



Continuação do Parecer: 1.738.030

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_diagnosticoPATER_c.docx	26/07/2016 15:24:41	Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza	Aceito
Outros	respostas.pdf	09/06/2016 10:44:45	Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_diagnosticoPATER_b.docx	09/06/2016 10:43:26	Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_controlePATER_b.docx	09/06/2016 10:42:25	Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_diagnosticoGARDENVILLE_b.docx	09/06/2016 10:42:10	Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_controleGARDENVILLE_b.docx	09/06/2016 10:41:48	Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza	Aceito
Outros	checklist.pdf	10/05/2016 10:51:48	Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza	Aceito
Outros	Declaracao_coparticipacaoPATER.pdf	10/05/2016 10:50:22	Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza	Aceito
Outros	Declaracao_coparticipacao_GardenVille.pdf	10/05/2016 10:49:46	Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEdiagnosticoPATER.docx	10/05/2016 10:46:12	Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEdiagnosticoGRANVILLE.docx	10/05/2016 10:45:44	Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEcontrolePATER.docx	10/05/2016 10:45:26	Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEcontroleGRANVILLE.docx	10/05/2016 10:45:08	Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	12/04/2016 11:59:39	Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza	Aceito

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - Térreo

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.080-240

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - SETOR DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -



Continuação do Parecer: 1.738.030

Outros	utilizacao_dados013.pdf	12/04/2016 11:55:54	Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza	Aceito
Outros	Termo_compromisso_inicio_pesquisa_d oc11.pdf	12/04/2016 11:55:04	Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza	Aceito
Outros	uso_especifico010.pdf	12/04/2016 11:54:13	Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza	Aceito
Outros	Declaracao_tomar_publico_resultados_ doc9.pdf	12/04/2016 11:53:29	Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza	Aceito
Outros	confidencialidade008.pdf	12/04/2016 11:52:43	Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza	Aceito
Outros	Ciencia_orientador_doc4.pdf	12/04/2016 11:51:01	Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza	Aceito
Outros	analise_merito003.pdf	12/04/2016 11:49:17	Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza	Aceito
Outros	ata.pdf	12/04/2016 11:48:41	Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza	Aceito
Outros	encamin_ata002.pdf	12/04/2016 11:47:43	Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza	Aceito
Outros	documento_1.pdf	12/04/2016 11:45:29	Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza	Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto_assinada.pdf	12/04/2016 11:44:15	Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CURITIBA, 21 de Setembro de 2016

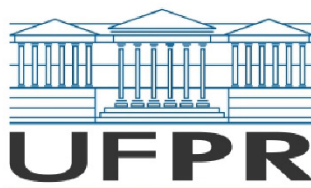
Assinado por:
IDA CRISTINA GUBERT
(Coordenador)

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - Térreo
Bairro: Alto da Glória
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3360-7259

CEP: 80.060-240

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

APÊNDICE 2 – APROVAÇÃO DE USO DE ANIMAIS PELO CEUA/BIO - UFPR



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Nº 1289

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22nd 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

PROCESSO/PROCESS: 23075.045138/2019-88

APROVADO/APPROVAL: 30/07/2019 – R.O. 06/2019

TÍTULO: Suplementação com vitaminas B na doença de Parkinson e seus efeitos na olfação.

TITLE: Vitamin B supplementation in Parkinson's disease and its effects on olfaction.

AUTORES/AUTHORS: Marcelo de Meira Santos Lima, Daniel Araújo Macedo, Lais Soares Rodrigues, Adriano Targa Dias Santos.

DEPARTAMENTO/DEPARTMENT: Fisiologia

Profa. Dra. Katya Naliwaiko
Coordenadora da CEUA



Documento assinado eletronicamente por ISELEN ABREU FLORENTINO IVANOSKI, MEDICO VETERINARIO, em 28/08/2019, às 13:14, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida [aqui](#) informando o código verificador 2072024 e o código CRC 0551CF15.

ANEXO 1 – MINI-EXAME DO ESTADO MENTAL (MEEM)

MINI-EXAME DO ESTADO MENTAL

(Folstein, Folstein & McHugh, 1.975)

Paciente: _____

Data da Avaliação: ____/____/____ Avaliador: _____

ORIENTAÇÃO

- Dia da semana (1 ponto)()
- Dia do mês (1 ponto)()
- Mês (1 ponto)()
- Ano (1 ponto)()
- Hora aproximada (1 ponto)()
- Local específico (apartamento ou setor) (1 ponto)()
- Instituição (residência, hospital, clínica) (1 ponto)()
- Bairro ou rua próxima (1 ponto)()
- Cidade (1 ponto)()
- Estado (1 ponto)()

MEMÓRIA IMEDIATA

- Fale 3 palavras não relacionadas. Posteriormente pergunte ao paciente pelas 3 palavras. Dê 1 ponto para cada resposta correta()
- Depois repita as palavras e certifique-se de que o paciente as aprendeu, pois mais adiante você irá perguntá-las novamente.

ATENÇÃO E CÁLCULO

- (100 - 7) sucessivos, 5 vezes sucessivamente (1 ponto para cada cálculo correto)()
- (alternativamente, soletrar MUNDO de trás para frente)

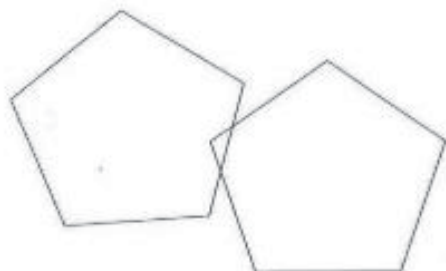
EVOCAÇÃO

- Pergunte pelas 3 palavras ditas anteriormente (1 ponto por palavra)()

LINGUAGEM

- Nomear um relógio e uma caneta (2 pontos)()
- Repetir "nem aqui, nem ali, nem lá" (1 ponto)()
- Comando: "pegue este papel com a mão direita dobre ao meio e coloque no chão (3 pts)()
- Ler e obedecer: "feche os olhos" (1 ponto)()
- Escrever uma frase (1 ponto)()
- Copiar um desenho (1 ponto)()

SCORE: (___/30)



ANEXO 2 – ATIVIDADES INSTRUMENTAIS DE VIDA DIÁRIA (PFEFFER)

ATIVIDADES INSTRUMENTAIS DE VIDA DIÁRIA – PFEFFER

Paciente: _____ Data: _____

01. Ele(a) manuseia seu próprio dinheiro?	0	1	2	3
02. Ele(a) é capaz de comprar roupas, comida, coisas para a casa sozinho(a) ?	0	1	2	3
03. Ele(a) é capaz de esquentar a água para o café e apagar o fogo?	0	1	2	3
04. Ele(a) é capaz de preparar uma comida?	0	1	2	3
05. Ele(a) é capaz de manter-se em dia com as atualidades, com os acontecimentos da comunidade ou da vizinhança?	0	1	2	3
06. Ele(a) é capaz de prestar atenção, entender e discutir um programa de rádio ou televisão, um jornal ou uma revista?	0	1	2	3
07. Ele(a) é capaz de lembrar-se de compromissos, acontecimentos familiares, feriados?	0	1	2	3
08. Ele(a) é capaz de manusear seus próprios remédios?	0	1	2	3
09. Ele(a) é capaz de passear pela vizinhança e encontrar o caminho de volta pra casa?	0	1	2	3
10. Ele(a) pode ser deixado(a) em casa sozinho(a) de forma segura?	0	1	2	3
Total: _____/30				

Pontuação:

- 0 - Normal, ou nunca fez, mas poderia fazê-lo agora;
- 1 - Faz com dificuldades, ou nunca o fez e agora teria dificuldade;
- 2 - Necessita de ajuda;
- 3 - Não é capaz.

ANEXO 3 – AVALIAÇÃO CLÍNICA DE DEMÊNCIA (CDR)

Demência	Nenhuma CDR 0	Questionável CDR 0,5	Leve CDR 1	Moderada CDR 2	Grave CDR 3
Memória	Sem perda da memória; esquecimento inconstante	Esquecimento leve consistente, relembra parcialmente eventos. "Esquecimento Benigno".	Perda moderada da memória, mais acentuada para eventos recentes. Interferência nas atividades da vida diária.	Perda grave da memória; com retenção apenas de dados fortemente consolidados, novos dados são rapidamente perdidos.	Perda grave da memória; apenas fragmentos permanecem.
Orientação	Orientação plena.	Orientação plena, exceto dificuldade branda com datas.	Dificuldade moderada com datas, orientado quanto ao "espaço" onde se realiza o exame; pode apresentar desorientação geográfica.	Dificuldade grave com datas; desorientação usual quanto ao tempo. Permanece quanto ao espaço.	Orientação apenas em relação a pessoas.
Julgamento e resolução de problemas	Resolve problemas do dia-a-dia, incluindo atividades comerciais e financeiras; capacidade de julgamento adequado quando comparada ao desempenho anterior.	Incapacidade leve para resolver problemas, identificar similaridades e diferenças.	Dificuldade moderada no manejo de problemas, identificação de similaridades e diferenças. Julgamento social usualmente preservado.	Enorme incapacidade para manejar problemas, similaridades e diferenças. Julgamento social comprometido.	Incapaz de fazer julgamentos ou resolver problemas.
Assuntos Comunitários	Funcionalmente independente ao nível usual de trabalho, compras, atividades voluntárias e grupos sociais.	Leve incapacidade nestas atividades.	Incapaz de funcionar independentemente nestas atividades, ainda que possa se engajar em algumas. Parece normal quando casualmente inspecionado.	Sem pretensão de manter funções independentes fora do domicílio. Parece suficientemente bem para ser levado a atividades fora do domicílio.	Parece muito doente para ser levado para fora do domicílio.
Atividades domésticas e passatempo	Vida doméstica, passatempo e interesse intelectual bem mantidos	Vida doméstica, passatempo e interesse intelectual levemente comprometidos.	Incapacidade leve, porém definitiva, para atividades do lar. Abandono de atividades mais difíceis e passatempos complicados. Outros interesses abandonados.	Somente as ações simples estão preservadas; interesse restrito.	Ausência de atividades significantes no domicílio.
Cuidado Pessoal	Plenamente capaz de manter auto-cuidados.	Plenamente capaz de manter auto-cuidados.	Necessita de "incentivo".	Requer assistência no vestuário, higiene e manejo de itens pessoais.	Requer muita ajuda no cuidado pessoal; incontinência freqüente.

ANEXO 4 - ESCALA DE DEPRESSÃO GERIÁTRICA (GDS)

ESCALA GERIÁTRICA DE DEPRESSÃO (GDS-15 E GDS-5)

Paciente: _____ Data: _____

GD S-5	01. Você está satisfeito, de modo geral, com sua vida?	SIM	NÃO	GDS -15
	02. Você tem ficado aborrecido com frequência?	SIM	NÃO	
	03. Você se sente inútil do jeito que está hoje?	SIM	NÃO	
	04. Você prefere mais ficar em casa do que sair e fazer coisas novas?	SIM	NÃO	
	05. Você se sente sem esperança da situação atual em que se encontra?	SIM	NÃO	
	06. Você tem medo que alguma coisa de ruim lhe aconteça? (Sempre está a cabeça)	SIM	NÃO	
	07. Você se sente frequentemente desamparado?	SIM	NÃO	
	08. Você acha que é maravilhoso estar vivo agora?	SIM	NÃO	
	09. Você acha que sua vida está vazia?	SIM	NÃO	
	10. Você acha que a maioria das pessoas está melhor que você? (estado geral)	SIM	NÃO	
	11. Você acha que tem mais problemas de memória do que a maioria? (mesma idade)	SIM	NÃO	
	12. Você deixou muitos de seus interesses e atividades? (abriu mão nos últimos tempos)	SIM	NÃO	
	13. Você está de bom humor a maior parte do tempo?	SIM	NÃO	
	14. Você se sente cheio de energia?	SIM	NÃO	
	15. Você se sente feliz a maior parte do tempo?	SIM	NÃO	
				Total: _____

Pontuação:

- Os escores inferiores a 05 são normais;
- Entre 05 e 10 indicam depressão leve a moderada;
- Escores maiores que 10 indicam depressão grave.