



INFLUÊNCIA DE MICRORNAS NA EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA PATOGÊNESE DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Breno da Nóbrega Bezerra¹

Luanna Sales da Costa²

Caíque Silveira Martins da Fonseca³

Carlos Eduardo Miranda de Souza⁴

RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa responsável pela maioria dos casos de demência no mundo. Apesar dos esforços para compreender o papel dos genes associados, muito de seus mecanismos permanece pouco compreendido e dificulta o desenvolvimento de melhores métodos de diagnóstico e terapia. Recentemente, os miRNAs surgiram como fatores associados a diferentes mecanismos fisiopatológicos em diferentes doenças. Identificar genes regulados negativamente e miRNAs regulados positivamente no tecido cerebral de pacientes com DA para esclarecer como eles poderiam interagir. Dados recuperados do Gene Expression Omnibus (GEO) foram analisados na ferramenta GEO2R. A análise de agrupamento foi feita nos softwares *Gene Ontology* (GO) e Excel. miRNA. A análise de predição da interação mRNA-miRNA foi realizada no banco de dados *miRWalk*. Ambos os conjuntos de dados estudados mostraram um número muito alto de DEG regulados negativamente. A análise de similaridade mostrou 913 DEG comuns entre eles. Segundo a análise do GO, esses genes estão ligados a cerca de 601 processos biológicos. A análise de agrupamento nestes cinco grupos mais significativos resultou em 18 genes. Alguns deles têm sido associados a processos comuns na DA. Cinco miRNA foram regulados positivamente e têm a capacidade de interagir com quatro dos genes previamente identificados. Os resultados demonstram potenciais novas redes entre os genes, bem como mostram possíveis interações entre eles e miRNAs relacionados à DA. De fato, revela uma possível melhor compreensão da patogênese da DA e, mais adiante, possíveis novos alvos terapêuticos e diagnósticos.

Palavras-chave: doença de Alzheimer; miRNA; bioinformática.

¹Discente do Curso de Medicina da Afya Faculdade de Ciências Médicas Jaboatão. E-mail: breno.nobrega94@gmail.com

²Discente do Curso de Medicina da Afya Faculdade de Ciências Médicas Jaboatão. E-mail: sales.luanna27@gmail.com

³Docente do Curso de Enfermagem da Faculdade dos Palmares. E-mail: caiquesmfonseca@gmail.com



ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder responsible for the most cases of dementia worldwide. Despite all efforts to comprehend the key role associated genes, much of their pathways and networks remain poorly understood and therefore hinder the development of better diagnostic and therapy methods. Recently, miRNAs have emerged as putative factors associated with different pathophysiological mechanisms throughout the body. Thus, this paper aims to identify downregulated genes and upregulated miRNAs in AD patient brain tissue to clarify how they could interact. Data retrieved from Gene Expression Omnibus (GEO) was analyzed on the GEO2R tool and expression level was defined by the log₂ fold-change. Clustering analysis was made on Gene Ontology and Excel software. miRNA. The mRNA-miRNA interaction prediction analysis was carried out in the miRWalk database. Both studied datasets showed a very high number of downregulated DEG. Similarity analysis showed 913 common DEG between them. According to GO analysis, these genes are linked to about 601 Biological Processes. Clustering analysis on these five most significant groups resulted in 18 genes. Some of them have been linked to common processes in AD. Five miRNA were upregulated and have the capacity to interact with four of the previously identified genes. The results demonstrate potential novel networks among 18 genes involved in AD pathogenesis as well as show possible novel interactions between them and miRNAs related to AD. In fact, it reveals possible better understanding of AD pathogenesis and, further on, possible novel therapeutic and diagnostic targets.

1 INTRODUÇÃO

A Doença de Alzheimer (DA) é uma condição patológica decorrente da perda da função neuronal cognitiva que afeta principalmente a memória, gerando grande impacto social para o indivíduo. Segundo a previsão da *Alzheimer's Disease International*, existem mais de 30 milhões de pessoas em todo o mundo que vivem com DA e o número de pessoas com a patologia dobrará a cada 20 anos, com aumento relativo ainda maior em países em desenvolvimento, como o Brasil (“Dementia statistics | Alzheimer's Disease International (ADI)”, [s.d.]). Tendo isso em vista, a Organização Mundial da Saúde reconhece a doença como uma prioridade global de saúde pública, incentivando pesquisas sobre o assunto. No entanto, a DA é um desafio da neurociência atual devido a sua alta complexidade patológica, resultando na dificuldade diagnóstica e na inexistência de tratamento eficaz e cura (SCHELTENS et al., 2021).



2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A priori, patologicamente, a DA é caracterizada pela deposição de placas amiloides, e emaranhados neurofibrilares no cérebro do paciente. As placas amiloides ou placa senis são agregados de peptídeos β -amiloide, que quando aglutinados entre os neurônios, impedem a transmissão de sinais, prejudicando cognitivamente a atividade cerebral do indivíduo. Já os emaranhados neurofibrilares são agregados de proteína tau hiperfosforilada. Em condições normais, essas proteínas executam função de estabilizar os microtúbulos nos neurônios, no entanto, quando acumuladas causam neurotoxicidade e podem levar à morte neuronal e, em conjunto com β -amiloides, ao processo neurodegenerativo caracterizando a DA (KHAN et al., 2020). Entretanto, sabe-se que a DA é uma doença multifatorial, em que os fatores ambientais e genéticos influenciam o desenvolvimento da patologia e, apesar de muitos estudos, muitos mecanismos ainda não são bem compreendidos.

A DA pode ter um início precoce, devido a mutações raras, ou um início tardio que pode ser influenciado por fatores de risco genéticos que levam o indivíduo a uma maior susceptibilidade de desenvolver a doença. Por um lado, a maioria dos casos são DA de início tardio, cujos sintomas se desenvolvem após os 65 anos, por outro lado, cerca de 1% dos casos da DA têm um aparecimento precoce e possuem alguns genes determinados que por herança de mutações culminam no desenvolvimento da doença antes dos 65 anos. Nesse viés, após vários anos de pesquisa, obteve-se uma maior, mas não completa, compreensão da genética associada à patogênese da DA (KANEKIYO; XU; BU, 2014; PERNECZKY et al., 2024; PUGLIELLI; TANZI; KOVACS, 2003; YAMAZAKI et al., 2019; ZHAO et al., 2018).

A DA de início tardio apresenta herdabilidade de 58 a 79% e a de início precoce mostra mais de 90% (SIMS, HILL, WILLIAMS, 2020). Sabe-se que mutações nos genes presenilina 1 (PSEN1), proteína precursora de amiloide (APP) e presenilina 2 (PSEN2) resultam uma acelerada produção de β -amiloide e, com isso, o desenvolvimento da DA familiar de início precoce. A DA de início tardio possui associação amplamente estudada com o gene Apolipoproteína E (APOE), que está associado a formação e não depuração de placas amiloides e emaranhados neurofibrilares. Nesse sentido, a genética da forma familiar de início precoce da DA resultou em uma melhor compreensão da fisiopatologia da doença. No entanto, a forma



mais prevalente da DA, a DA de início tardio, tem mecanismos e genes influenciadores que ainda permanecem inexplicados e incertos (WILLIAMSON; GOLDMAN; MARDER, 2009).

Historicamente, devido aos achados patológicos da doença nas necrópsias, que mostravam as placas amiloides e emaranhados neurofibrilares no tecido neuronal dos pacientes, os genes mais investigados para compreender o Alzheimer eram os que envolviam a cascata amiloide (ZHANG et al., 2023). No entanto, além das vias de depuração de placas amiloides e emaranhados fibrilares, a DA, por ser uma doença multifatorial, apresenta influências genéticas associadas a outras vias como a do metabolismo de colesterol e processos inflamatórios (SIMS; HILL; WILLIAMS, 2020). Desse modo, é essencial a busca de genes ligados a outros processos que possam desempenhar um papel importante na fisiopatologia e na maior susceptibilidade a DA. Com isso, compreender de forma profunda os quesitos genéticos da DA pode levar à detecção, prevenção e tratamento precoces, tendo em vista que os tratamentos medicamentosos são mais eficazes nos estágios iniciais da DA e não quando a doença já causou neurodegeneração extensa, além de apresentar novos alvos para as terapias genéticas.

Além disso, várias estruturas podem interagir com os genes, dentre elas estão os MicroRNAs (miRNAs), que são classes de RNA de fita simples não codificadores de proteína que podem modular expressões gênicas e, dessa forma, estarem envolvidos com órgãos e patologias específicas, tornando-se, inclusive, biomarcadores para diagnóstico e terapias genéticas (AERQIN et al, 2022; FERRARI; SORBI, 2021; GRAFF-RADFORD et al, 2021; KLYUCHEREV et al, 2022; TAN; YU; TAN, 2014).

Mais de 2600 miRNAs já foram preditos através de análises do genoma humano. Esse quantitativo já encontrado teria o potencial de modular negativamente mais de 15 mil genes por meio de ligações em regiões específicas do RNA mensageiro (mRNA) e formações de complexos de silenciamento induzido por RNA (RISC). Como resultado, o miRNA causaria a supressão da tradução e degradação dos mRNAs. Com isso, os miRNAs têm se tornado objeto de investigação para melhor compreensão do processo da fisiopatogênese e talvez novos alvos terapêuticos de doenças que têm um componente genético presente no processo saúde-doença (ALQURASHI et al, 2019; DENK et al., 2018).



Walsh, Nguyen, Binder (2021) relatam a aplicação de alguns miRNAs como potenciais marcadores para diagnóstico da Esclerose Múltipla (MS) e a expressão desregulada dessas moléculas em pacientes com MS sugerem sua intrínseca relação na fisiopatogenia da doença. Segundo eles, os miRNAs envolvidos interferem nas vias de inflamação, glicose, mielinização e desmielinização do sistema nervoso central (SNC). Além dos efeitos diretamente ligados a doenças do sistema nervoso, os miRNAs têm sido envolvidos com diferentes situações patológicas relacionadas a modificações metabólicas como as que são encontradas em estudos epidemiológicos envolvendo a DA.

Morishita et al. (2021) reportam a relação entre miRNA com o carcinoma hepatocelular (HCC), podendo inclusive servir como marcador diagnóstico e alvo terapêutico. Segundo eles, os miRNAs podem ser divididos em onco-miRNA e miRNA supressores de tumor. Tais miRNAs, nesse caso, interferem em vias inflamatórias e em vias do metabolismo lipídico hepático, aumentando o estresse oxidativo que favorece o surgimento da esteatohepatite com progressão para cirrose e em sequência para carcinoma hepatocelular.

Segundo Suksangrat, Phannasil, Jitrapakdee (2019), os miRNAs estão envolvidos na modulação de processos regulatórios do metabolismo energético como a sensibilidade insulínica e o transporte de glicose, aumentando o risco de desenvolvimento da diabetes mellitus. Inclusive sendo mostrado que a inibição desses miRNAs apresenta melhora no quadro de resistência insulínica em modelos animais, o que evidencia o potencial uso terapêutico de inibidores desses miRNAs.

Atualmente, as formas diagnósticas para o Alzheimer incluem testes cognitivos, exames de neuroimagem e detecção de biomarcadores. Todavia, os métodos diagnósticos são dificultosos de diagnosticar a doença antes do surgimento dos sintomas, são exames caros e invasivos, respectivamente. Com isso, pelo que se sabe da patogênese da DA, a técnica ideal para diagnosticar a doença de Alzheimer seria a que pudesse identificar a doença em um tempo considerável antes do início dos sintomas, apresentar o menor custo e poder ser realizada em grande massa populacional como um método de rastreio (SIMS, HILL, WILLIAMS, 2020).

Nesse sentido, sabendo que diversos estudos encontraram dados suficientes para a utilização de miRNAs nos processos patológicos e sabendo o peso do fator genético na doença



de Alzheimer, a descoberta de miRNAs que atuam em genes relacionados à patogênese da DA é um enorme potencial para o diagnóstico precoce e inovação na terapia gênica da doença. Dessa forma, tendo em vista o grande impacto da doença de Alzheimer mundialmente, o estabelecimento de métodos diagnósticos e terapêuticos eficazes utilizando os miRNAs resultaria na melhor qualidade de vida para indivíduos já acometidos pela doença e para aqueles com altas chances de desenvolver a doença.

Assim, fica clara a capacidade deste estudo de contribuir para a progressão do entendimento sobre os fatores associados à DA. De maneira certamente aplicada e com potencial para impactar diretamente e positivamente sobre a vida de dezenas de milhões de pessoas em todo o mundo. Efeitos especialmente relevantes em países como o Brasil, que enfrentarão aumento substancial dos casos desta doença.

3 METODOLOGIA

A busca de genes relacionados à Doença de Alzheimer foi realizada no banco de dados *Gene Expression Omnibus* (GEO), que armazena diferentes conjuntos de dados selecionados com recursos avançados para a análise de níveis de expressão gênica. Utilizou-se as palavras-chave “*Alzheimer’s Disease*” e “*Gene Expression*”. Os resultados foram filtrados para a espécie *Homo sapiens*. Foram obtidos três *datasets*: GSE63063, GSE36980 e GSE118553. O primeiro utilizava amostra sanguínea, enquanto os dois últimos foram realizados por uma análise *post-mortem* a partir de amostras de diversas regiões do cérebro. Com o intuito de eliminar as possíveis diferenças possíveis de concentração de mRNAs em vesículas pertencentes a diferentes tecidos, o *dataset* GSE63063 foi retirado do estudo.

O GSE36980 utiliza amostras de RNAs extraídas de tecidos cerebrais *post-mortem* além de amostras de RNAs isoladas do hipocampo dos modelos animais de Alzheimer, camundongos triplo transgênicos (3xTg-AD). As amostras foram divididas em grupos com Alzheimer, sem Alzheimer e com demência vascular. Além disso, o perfil de expressão também foi comparado entre sexos dos pacientes. O *dataset* GSE118553 é formado por amostras humanas de tecidos cerebrais e cerebelo de diferentes grupos: sem Alzheimer, com Alzheimer assintomático



(alterações compatíveis com Alzheimer, mas sem alteração cognitiva) e aqueles com Alzheimer. O primeiro estudo foi realizado no Japão enquanto o segundo ocorreu na Inglaterra.

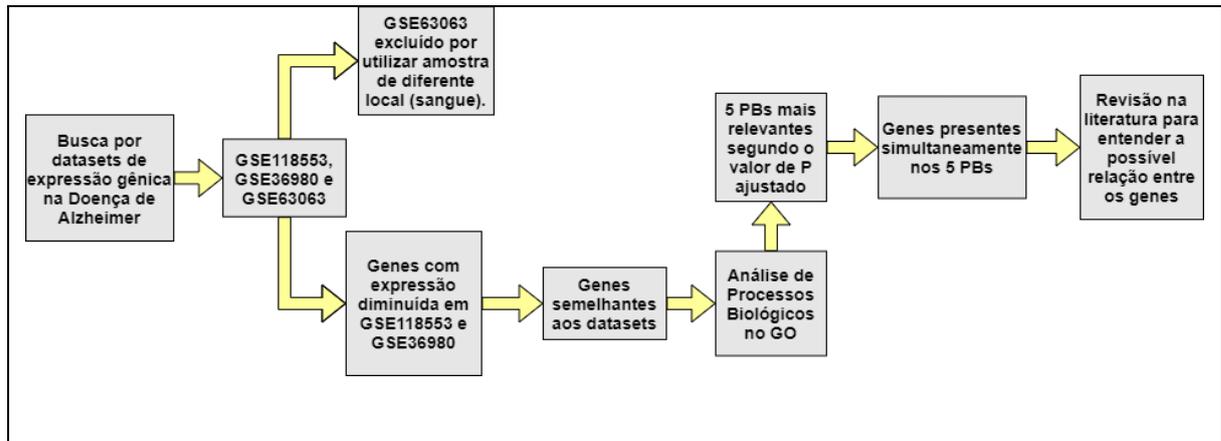
Para nosso estudo foram utilizados e comparados apenas os dados dos grupos de pacientes que apresentavam Alzheimer com aqueles sem a doença. Os grupos possuíam amostras de diferentes regiões e não houve separação de subgrupos de acordo com o gênero.

Cada *dataset* foi analisado pela ferramenta GEO2R para obtenção dos genes com expressão diferenciada (DEG). Foi considerado como estatisticamente significativo o valor de $p < 0,05$. Para eliminar a taxa de descobertas falsas (FDR), o valor de p foi ajustado pelo teste de Benjamini-Hochberg. Aqueles com significância estatística foram selecionados e tabulados no Excel para análise do nível de expressão. Foram escolhidos os genes com expressão diminuída (NDEG), em razão da presença de miRNAs provocar diminuição da expressão gênica. Posteriormente os dados selecionados dos *datasets* GSE118553 e GSE36980 passaram por uma análise comparativa em busca de genes presentes nos dois estudos.

A lista unificada dos NDEG foi analisada no site *Gene Ontology* para identificação dos principais processos biológicos que poderiam ser afetados pela disfunção dos genes com expressão diminuída. Os 5 processos com os menores valores de p foram selecionados para uma análise de semelhança na tentativa de encontrar genes que participassem dos 5 processos biológicos de maior significância. Essa etapa foi realizada com o objetivo de buscar possíveis “*Hub genes*” na lista final.

Os genes obtidos na análise de semelhança dos processos biológicos foram catalogados e estudados na base de dados gênica humana *GeneCards*. Nessa base foram recuperadas informações gerais do gene como número de identificação de acordo com *NCBI Entrez Gene* e suas funções moleculares (**Quadro 1**).

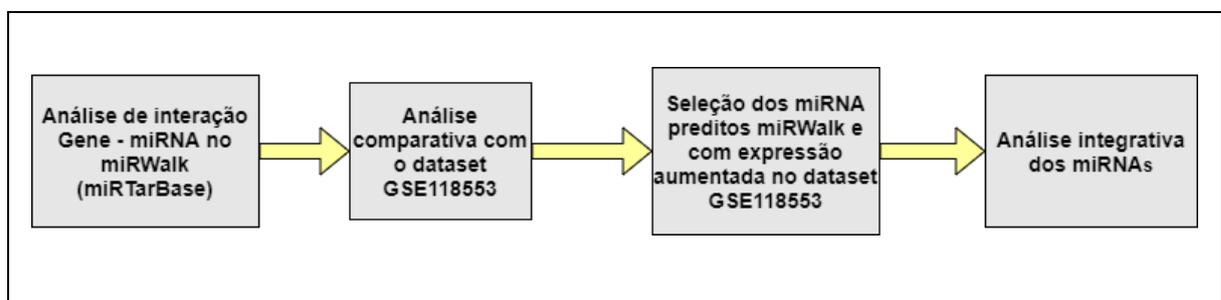
--



Quadro 1: Sequência de atividades para a identificação dos genes de interesse do estudo.

O miRNAs foram obtidos de duas fontes: *dataset* de expressão gênica e por análise computacional de predição de interações. O *dataset* utilizado foi o GSE118553, o mesmo que também serviu para o fornecimento da alteração da expressão de genes.

A análise de predição de interação mRNA-miRNA foi feita na base de dados *miRWalk*. Essa base utiliza diversos algoritmos que melhoram a acurácia da predição de interação, além de ser atualizada duas vezes ao ano. Ademais, é possível comparar com outras bases como *TargetsScan* e *Mirtarbase*. Para esse estudo consideramos apenas os miRNA preditos pela *miRWalk* e que estavam na base *Mirtarbase*. Esse critério tem por finalidade filtrar aqueles miRNA que já foram validados através de ensaios. As duas listas obtidas de cada fonte passaram por uma análise de semelhança para manter aqueles que foram preditos pelo *miRWalk* e estavam presentes no *Dataset* GSE118553 (**Quadro 2**).



Quadro 2: Sequência de atividades para identificação dos miRNAs de interesse do estudo.



4 RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1 PROCESSOS BIOLÓGICOS (PBs)

Os conjuntos de dados GSE1188553 e GSE36980 têm 913 genes regulados negativamente em comum. Uma lista com esses genes foi carregada no *Gene Ontology* para enriquecer e descobrir em quais processos biológicos eles estavam envolvidos. Depois de classificá-los pelo valor de p ajustado, chegamos aos 5 PBs mais importantes de acordo com este estudo, apresentados na **Tabela 1**.

Tabela 1: Processos Biológicos dos genes regulados negativamente.

Processo Biológico	Número de Genes Identificados
Regulação da sinalização trans sináptica	86
Modulação da transmissão sináptica química	86
Desenvolvimento do sistema nervoso	214
Regulação de transporte	176
Transporte	335

Segundo Dovrolis et al. (2022) o maior cluster foi aquele relacionado ao desenvolvimento do sistema nervoso, seguido pela morfogênese, axonogênese, orientação do axônio, regulação da regeneração e extensão do axônio. Além disso, BPs como “transmissão de sinapses químicas” e “transporte de íons” estiveram presentes nos resultados. É importante destacar que esta análise foi realizada a partir de uma lista de cruzamento de DEGs para memória de diferentes etiologias e DEGs em estudos de DA.

Um estudo de perfil de proteoma a partir de modelos animais por Kim et al. (2019), revelou que alguns PBs estavam alterados em diferentes estágios do dano. Os processos de transmissão sináptica foram alterados apenas nos estágios finais da doença. Tais resultados são compatíveis com o observado em nossas análises.



4.2 GENES DE INTERESSE

Os genes presentes em todos os 5 BPs foram pesquisados. Isso foi feito como forma de filtrar os genes mais importantes de acordo com o provável elevado número de processos biológicos que poderiam apresentar mau funcionamento devido à sua expressão prejudicada. Nessa perspectiva, foram obtidos 18 genes (Tabela 2).

Tabela 2: Genes de interesse identificados

Sigla	Identificação completa
ADCYAP1	<i>Adenylate Cyclase Activating Polypeptide</i>
GRIN2A	<i>Glutamate Receptor, Ionotropic, N-Methyl-D-Aspartate, Subunit 2A</i>
RAB3A	<i>Ras-Related Protein Rab-3A</i>
APBA1	<i>Amyloid Beta Precursor Protein Binding Family A Member 1</i>
MAP1B	<i>Microtubule Associated Protein 1B</i>
STXBP1	<i>Syntaxin Binding Protein 1</i>
APP	<i>Amyloid Beta Precursor Protein</i>
NLGN2	<i>Neuroigin 2</i>
SYN1	<i>Synapsin I</i>
CDK5	<i>Cyclin Dependent Kinase 5</i>
NRXN1	<i>Neurexin</i>
SYT1	<i>Synaptotagmin 1</i>
CREB1	<i>cAMP Responsive Element Binding Protein 1</i>
PPP3CB	<i>Protein Phosphatase 3 Catalytic Subunit Beta</i>
SYT4	<i>Synaptotagmin 4</i>
DNM1L	<i>Dynamin 1 Like</i>
PRKCZ	<i>Protein Kinase C Zeta</i>
SLC6A4	<i>Solute Carrier Family 6 Member 4</i>

A análise realizada no Cytoscape identificou a família da proteína codificada pelo gene, bem como a interação entre essas proteínas (PPI). As proteínas identificadas pertencem a cinco

grandes famílias: enzimas, fatores de transcrição, canais iônicos, quinases e transportadores. As proteínas com maior grau de interações são SYN1 (13), APP (10), SYT1 (10) e GRIN2A (10). Isso indica a tendência dessas proteínas de se concentrarem no grupo. A proteína PRKCZ foi a única fora da rede PPI (**Figura 1**).

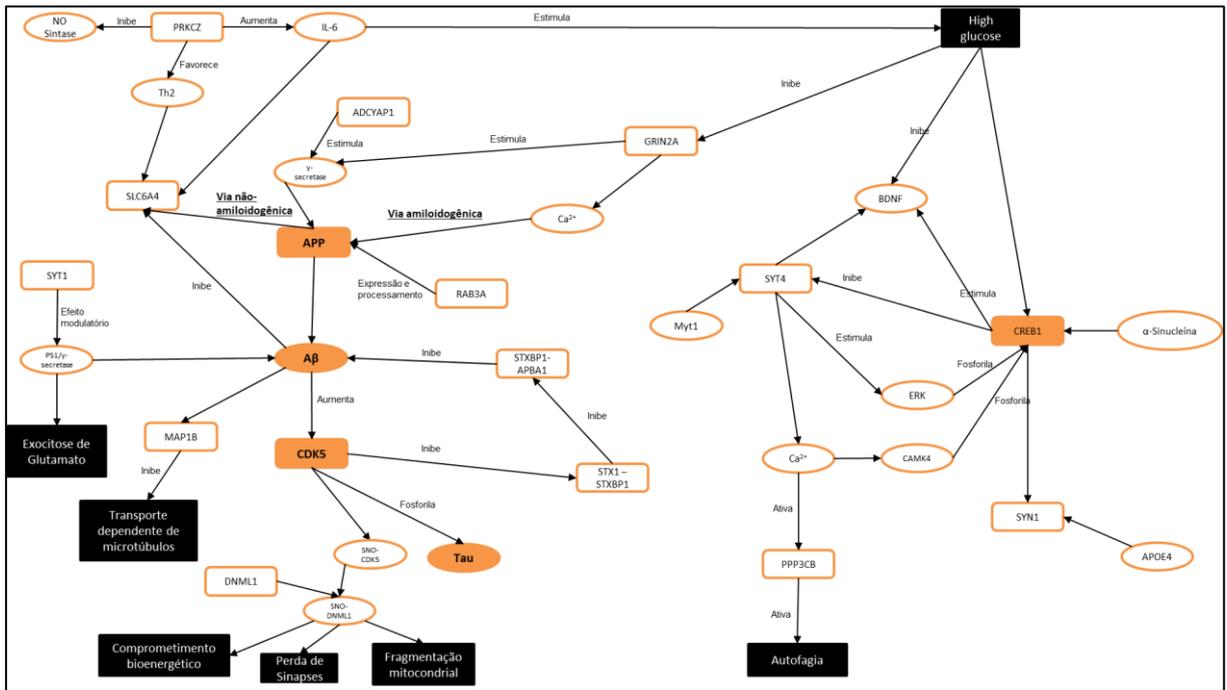


Figura 1: Modelo de Interações Proteína-Proteína (PPI) identificadas no estudo. Genes identificados em nosso estudo, com destaque (laranja) para aqueles mais tradicionalmente envolvidos com a patogênese da Doença de Alzheimer, bem como possíveis repercussões fisiológicas de suas interações (preto).
Fonte: Produzida pelos autores.

A maioria dos genes de interesse filtrados pela metodologia estabelecida no presente estudo estão sendo estudados ao longo das décadas, como APP, ADCYAP1 e APBA1 (KUNKLE et al, 2019). Além disso, estes genes participam de vias relacionadas à proteína amiloide. É importante lembrar que a presente análise foi realizada apenas com genes regulados negativamente.

Além disso, existem muitos modelos animais e estudos que mencionam a superexpressão do gene APP. Porém é um dos genes com expressão reduzida. É importante



saber se a expressão do gene APP muda ao longo da progressão da doença, tornando-se regulada negativamente após o acúmulo de beta amiloide ($A\beta$).

4.3 miRNAs REGULADOS POSITIVAMENTE

Tendo em vista a investigação da participação dos miRNAs na redução da expressão dos genes identificados, a prospecção dos diferentes miRNAs foi feita em um processo de duas etapas. O primeiro passo consistiu em filtrar o miRNA regulado positivamente presente nos dados do GSE118553. Em segundo lugar, foi realizada uma análise de previsão de alvos no *miRWalk*, escolhendo apenas o *MiRTarBase* como fonte. Verificou-se que apenas cinco miRNAs regulados positivamente em GSE118553 também estavam na previsão alvo da análise *miRWalk*. Esses miRNAs são hsa-mir-1185, hsa-mir-16, hsa-mir-205, hsa-mir-424 e hsa-mir-578.

4.3.1 hsa-mir-16

O miR-16-5p pertence à família miR-15/107. Esta família de grupos possui muitos miRNAs já conhecidos por estarem alterados na DA. Poderia ter como alvo o gene APP, que foi regulado negativamente em nosso estudo (BATTAGLIA et al. 2019).

Altos níveis foram detectados em cérebros de pacientes com DA. Sua expressão regulada positivamente está relacionada principalmente a áreas ricas em $A\beta$. Traz a correlação entre a deposição de $A\beta$ e a expressão do miR-16 (BOTTERO et al. 2021). Pode ser uma tentativa ineficaz de impedir a progressão dos danos.

Além disso, astrócitos tratados com IL-1 β e TNF α liberam vesículas extracelulares contendo miR-16-5p que interferem nas vias neurotróficas, especialmente no gene NTRK3 (CHAUDHURI et al., 2018; KIM et al. 2020).

4.3.2 hsa-mir-205

O miR-205 está relacionado à neuroinflamação além da adesão, ativação, recrutamento e tolerância de linfócitos em modelos animais (MARTYNIUK et al., 2020). Além disso, é expresso em pacientes pós-AVC e está relacionado com o gene ETNK1 (SUN et al. 2020).



Segundo Moreno-García et al. (2020), o miR-205 regula negativamente a expressão de MAPK1 e LRRK2. Esses genes estão envolvidos nas vias de neuroinflamação. Portanto, o aumento da sua expressão poderia ser uma resposta a um aumento do estado inflamatório.

Sabe-se também que em algumas doenças crônicas sua expressão está alterada. Com base em Langlet et al. (2018), níveis elevados de insulina poderiam inativar o gene FOXO e consequentemente aumentar a expressão do miR-205. Porém, quando a resistência à insulina avança, os pacientes entram em estado hiperglicêmico e o FOXO é reativado no fígado, suprimindo o miR-205.

4.3.3 hsa-mir-424

Assim como o hsa-mir-16, pertence à família miR-15/107. Seu nível está aumentado em pacientes com DA quando comparados a indivíduos saudáveis. Porém não há diferença quando comparamos o miR-424 do grupo DA com comprometimento cognitivo leve e demência vascular (LI et al., 2020). Esta falta de significância entre estes três grupos poderia indicar que o miR-424 está relacionado com estágios iniciais e modificações vasculares.

De maneira semelhante, Wang et al. (2019) reportam que o miR-424 regula a proliferação celular, o metabolismo e está envolvido em doenças neurodegenerativas. Além disso, é regulado positivamente após hipóxia tecidual, bem como pelo TGF- β . Além disso, é o que mais altera sua expressão em consequência do estresse metabólico de todos os miRNAs pertencentes à família miR-15/107.

4.3.4 hsa-mir-1185

Segundo Garcia-Lacarte et al. 2019, o miR-1185 exerceria um efeito anti-inflamatório pela regulação da GSK3B. Este gene regula os níveis de algumas citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 e IL-6. Wang et al. (2020) destaca o pequeno número de literatura sobre este miRNA. A maioria dos estudos o associa ao câncer colorretal e à regulação positiva dos mecanismos de apoptose.

4.3.5 hsa-mir-578



Os estudos do miR-578 relacionam-no à tumorigênese e à resposta inflamatória. Os resultados apontam para a atuação do miR-578 na regulação de vias inflamatórias através do receptor *Toll-like 4* (TLR4), portanto exerce efeitos antiinflamatórios (GAO et al., 2022).

4.4 INTERAÇÕES GENE-miRNA

As interações entre os genes encontrados em nosso estudo e a biblioteca de miRNA já caracterizados foram previstas pelo software online *miRWalk*. Depois de executar a análise com nossos 18 genes comuns, foram encontradas 343 possíveis interações entre genes e os miRNAs. Havia 15 genes alvo de pelo menos um miRNA, enquanto 3 genes (CDK5, RAB3A e SYN1) não foram alvo de nenhum miRNA. Os genes CREB1 e APP foram os que tiveram mais interações, 119 e 71 respectivamente. Comparações entre estes miRNA e o miRNA regulado positivamente de GSE118553 resultaram em 5 miRNA, 4 genes e 6 possíveis interações, como apresentado na Tabela 3.

Tabela 3: Interações miRNA-Gene

miRNA	Gene
hsa-miR-1185	CREB1
hsa-miR-16	NRXN1; SLC6A4
hsa-miR-205	CREB1
hsa-miR-424	APP
hsa-miR-578	CREB1

CREB1 é um gene relacionado à atividade do fator de transcrição de ligação ao DNA e à ligação enzimática. Além disso, a proteína Creb1 é um fator de transcrição dependente de fosforilação que está envolvido em processos celulares como a sincronização da ritmicidade circadiana e a diferenciação de células adiposas. A proteína Amiloide β (A β), claramente envolvida na patogênese do Alzheimer, regula negativamente a transcrição mediada por CREB. Evidências de estudos em cérebros DA post-mortem sugerem que A β diminui o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) principalmente pela redução de CREB. Nesse



sentido, sabe-se que a expressão gênica mediada por CREB é necessária para memória de longo prazo e plasticidade sináptica (AMIDFAR et al., 2020).

A Neurexina-1 (gene NRXN1) é uma proteína de superfície celular responsável por interações célula-célula, exocitose de grânulos secretores e regulação da transmissão do sinal. As isoformas do tipo alfa desempenham um papel importante na transmissão do sinal sináptico, na regulação da atividade do canal de cálcio e na liberação de neurotransmissores desencadeada por Ca^{2+} nas sinapses e nas junções neuromusculares. Além disso, as isoformas do tipo alfa desempenham um papel na regulação da atividade dos receptores NMDA pós-sinápticos, um subtipo de canais iônicos dependentes de glutamato. De forma que ambas as isoformas podem desempenhar um papel na formação ou manutenção das junções sinápticas (SCHIEL, 2018).

SLC6A4 é o gene codificador do transportador de serotonina (SERT). Nesse sentido, doenças como distúrbios obsessivo compulsivo e de ansiedade estão associadas à disfunção desse transportador. Sua principal função é regular a sinalização serotoninérgica no sistema nervoso central através do transporte de moléculas de serotonina da fenda sináptica retornando para o terminal pré-sináptico. Na fisiopatologia do Alzheimer, já é bem estabelecido que existe uma disfunção serotoninérgica e redução de síntese e liberação de monoaminas nos cérebros doentes. Apesar da diminuição dos receptores de serotonina nas células que apresentam mutação APP_{swe}, indicando que a síntese de SERT pós-tradução é afetada pela patologia amiloide, não foi notada nenhuma mudança significativa na expressão do gene SERT (TAJEDDINN et al, 2015). Além disso, Estudos em camundongos mostram que a progressão da amiloidose cerebral está associada à neuroinflamação e à diminuição da atividade dos transportadores pré-sinápticos serotoninérgicos. Com isso, sugere-se que a atividade dos SERTs depende do nível intersticial de beta amiloide (METAXAS et al, 2019).

Por fim, e talvez essa seja a relevância mais forte das associações encontradas neste estudo, percebeu-se tanto a redução da expressão do gene APP quanto sua possível capacidade de interação com o hsa-mir-424, um dos que apresentaram maiores expressões nos tecidos afetados pela Doença de Alzheimer.

A proteína precursora Beta Amiloide (APP) funciona, além de outras maneiras, como um receptor de superfície celular e desempenha funções fisiológicas na superfície de neurônios



relevantes para o crescimento de neuritos, adesão neuronal e axonogênese. A interação entre as moléculas de APP nas células vizinhas promove a sinaptogênese (BAUMKÖTTER et al, 2014).

Além da importância neuronal, a APP é bastante expressa em células endoteliais das artérias cerebrais e periféricas, revelando que, em alterações patológicas, indivíduos são mais propensos a desenvolver doenças como aterosclerose e angiopatia amiloide cerebral (D'USCIO; HE; KATUSIC, 2017). Em animais, estudos mostraram que a deleção de APP aumenta a velocidade de deposição de A β (SOUTHAM et al, 2019; STEFFEN et al, 2017).

Desde que o acúmulo de proteína beta amiloide (assim como a formação de emaranhados neurofibrilares) é considerado um evento central na fisiopatologia da doença de Alzheimer, resultando em perda neuronal e sintomas característicos da doença, a influência do hsa-mir-424 merece investigações adicionais.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados encontrados em nosso estudo estão de acordo com o que vem sendo evidenciado pela literatura, desde que estes genes têm sido associados ao desenvolvimento da Doença de Alzheimer em diversos estudos, bem como avançam no que se refere a evidência de associação entre eles em amostras de tecido nervoso humano.

A ligação encontrada no presente estudo reforça essa associação fisiopatológica e abre caminho para estudos adicionais que investiguem os efeitos da modulação de tais miRNAs sobre a expressão destes genes e, conseqüentemente, sobre o desenvolvimento e/ou agravamento da Doença de Alzheimer.

REFERÊNCIAS

AERQIN, Q. et al. Omics-based biomarkers discovery for Alzheimer's disease. **Cell Mol Life Sci.**, v. 79, n. 12, p. 585, 8 nov. 2022. DOI: 10.1007/s00018-022-04614-6.

ALQURASHI, N. et al. miR-496, miR-1185, miR-654, miR-3183 and miR-495 are downregulated in colorectal cancer cells and have putative roles in the mTOR pathway. **Oncol Lett.**, v. 18, n. 2, p. 1657-1668, ago. 2019. DOI: 10.3892/ol.2019.10508.



AMIDFAR, M. et al. The role of CREB and BDNF in neurobiology and treatment of Alzheimer's disease. **Life Sci.**, v. 257, p. 118020, 15 set. 2020. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.118020.

BATTAGLIA, C. et al. Candidate Genes and MiRNAs Linked to the Inverse Relationship Between Cancer and Alzheimer's Disease: Insights From Data Mining and Enrichment Analysis. **Front Genet.**, v. 10, p. 846, 24 set. 2019. DOI: 10.3389/fgene.2019.00846.

BAUMKÖTTER, F. et al. Amyloid precursor protein dimerization and synaptogenic function depend on copper binding to the growth factor-like domain. **J Neurosci.**, v. 34, n. 33, p. 11159-72, 13 ago. 2014. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0180-14.2014. PMID: 25122912; PMCID: PMC6705248.

BOTTERO, V. et al. Key Disease Mechanisms Linked to Alzheimer's Disease in the Entorhinal Cortex. **Int J Mol Sci.**, v. 22, n. 8, p. 3915, 10 abr. 2021. DOI: 10.3390/ijms22083915..

CHAUDHURI, A. D. et al. TNF α and IL-1 β modify the miRNA cargo of astrocyte shed extracellular vesicles to regulate neurotrophic signaling in neurons. **Cell Death Dis.**, v. 9, n. 3, p. 363, 5 mar. 2018. DOI: 10.1038/s41419-018-0369-4.

ADI - Alzheimer's Disease International. **Dementia statistics**. [S.l.], [s.d.]. Disponível em: <<https://www.alzint.org/about/dementia-facts-figures/dementia-statistics/>>. Acesso em: 3 mar. 2021.

DENK, J. et al. Specific serum and CSF microRNA profiles distinguish sporadic behavioural variant of frontotemporal dementia compared with Alzheimer patients and cognitively healthy controls. **PLoS One**, v. 13, n. 5, p. e0197329, 10 maio 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0197329.

DOVROLIS, N. et al. Unlocking the Memory Component of Alzheimer's Disease: Biological Processes and Pathways across Brain Regions. **Biomolecules**, v. 12, n. 2, p. 263, 6 fev. 2022. DOI: 10.3390/biom12020263.

D'USCIO, L. V.; HE, T.; KATUSIC, Z. S. Expression and Processing of Amyloid Precursor Protein in Vascular Endothelium. **Physiology (Bethesda)**, v. 32, n. 1, p. 20-32, jan. 2017. DOI: 10.1152/physiol.00021.2016.

FERRARI, C.; SORBI, S. The complexity of Alzheimer's disease: an evolving puzzle. **Physiol Rev.**, v. 101, n. 3, p. 1047-1081, 1 jul. 2021. DOI: 10.1152/physrev.00015.2020.

GAO, Q. et al. circSTRN3 aggravates sepsis-induced acute kidney injury by regulating miR-578/ toll like receptor 4 axis. **Bioengineered**, v. 13, n. 5, p. 11388-11401, maio 2022. DOI: 10.1080/21655979.2022.2061293.



GARCIA-LACARTE, M. et al. miR-1185-1 and miR-548q Are Biomarkers of Response to Weight Loss and Regulate the Expression of GSK3B. **Cells**, v. 8, n. 12, p. 1548, 30 nov. 2019. DOI: 10.3390/cells8121548.

GRAFF-RADFORD, J. et al. New insights into atypical Alzheimer's disease in the era of biomarkers. **Lancet Neurol.**, v. 20, n. 3, p. 222-234, mar. 2021. DOI: 10.1016/S1474-4422(20)30440-3.

KANEKIYO, T.; XU, H.; BU, G. ApoE and A β in Alzheimer's disease: accidental encounters or partners? **Neuron**, v. 81, n. 4, p. 740-754, fev. 2014. DOI: 10.1016/j.neuron.2014.01.045.

KHAN, S.; BARVE, K. H.; KUMAR, M. S. Recent Advancements in Pathogenesis, Diagnostics and Treatment of Alzheimer's Disease. **Curr Neuropharmacol**, v. 18, n. 11, p. 1106-1125, 2020. DOI: 10.2174/1570159X18666200528142429.

KIM, D. K. et al. Deep proteome profiling of the hippocampus in the 5XFAD mouse model reveals biological process alterations and a novel biomarker of Alzheimer's disease. **Exp Mol Med**, v. 51, n. 11, p. 1-17, nov. 2019. DOI: 10.1038/s12276-019-0326-z.

KIM, E. et al. Deleterious Alteration of Glia in the Brain of Alzheimer's Disease. **Int J Mol Sci**, v. 21, n. 18, p. 6676, set. 2020. DOI: 10.3390/ijms21186676.

KLYUCHEREV, T. O. et al. Advances in the development of new biomarkers for Alzheimer's disease. **Transl Neurodegener**, v. 11, n. 1, p. 25, abr. 2022. DOI: 10.1186/s40035-022-00296-z.

LANGLET, F. et al. microRNA-205-5p is a modulator of insulin sensitivity that inhibits FOXO function. **Mol Metab**, v. 17, p. 49-60, nov. 2018. DOI: 10.1016/j.molmet.2018.08.003.

LI, F. et al. Profile of Pathogenic Proteins and MicroRNAs in Plasma-derived Extracellular Vesicles in Alzheimer's Disease: A Pilot Study. **Neuroscience**, v. 432, p. 240-246, abr. 2020. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2020.02.044.

MARTYNIUK, C. J. et al. Genetic ablation of bone marrow beta-adrenergic receptors in mice modulates miRNA-transcriptome networks of neuroinflammation in the paraventricular nucleus. **Physiol Genomics**, v. 52, n. 4, p. 169-177, abr. 2020. DOI: 10.1152/physiolgenomics.00001.2020.

METAXAS, A. et al. Neuroinflammation and amyloid-beta 40 are associated with reduced serotonin transporter (SERT) activity in a transgenic model of familial Alzheimer's disease. **Alzheimers Res Ther**, v. 11, n. 1, p. 38, maio 2019. DOI: 10.1186/s13195-019-0491-2.



MORENO-GARCÍA, L. et al. Competing Endogenous RNA Networks as Biomarkers in Neurodegenerative Diseases. **Int J Mol Sci**, v. 21, n. 24, p. 9582, dez. 2020. DOI: 10.3390/ijms21249582.

MORISHITA, A. et al. MicroRNAs in the Pathogenesis of Hepatocellular Carcinoma: A Review. **Cancers (Basel)**, v. 13, n. 3, p. 514, jan. 2021. DOI: 10.3390/cancers13030514.

PERNECZKY, R. et al. Anti-amyloid antibody treatments for Alzheimer's disease. **Eur J Neurol**. 2024 Feb;31(2):e16049. doi: 10.1111/ene.16049. Epub 2023 Sep 11.

PUGLIELLI, L.; TANZI, R. E.; KOVACS, D. M. Alzheimer's disease: the cholesterol connection. **Nat Neurosci**. 2003 Apr;6(4):345-51. doi: 10.1038/nn0403-345.

SHELTEINS, P. et al. Alzheimer's disease. **Lancet**. 2021 Apr 24;397(10284):1577-1590. doi: 10.1016/S0140-6736(20)32205-4.

SCHIEL, K. A new etiologic model for Alzheimers Disease. **Med Hypotheses**. 2018 Feb;111:27-35. doi: 10.1016/j.mehy.2017.12.015.

SIMS, R.; HILL, M.; WILLIAMS, J. The multiplex model of the genetics of Alzheimer's disease. **Nat Neurosci**. 2020 Mar;23(3):311-322. doi: 10.1038/s41593-020-0599-5.

SOUTHAM, K. A. et al. Knockout of Amyloid β Protein Precursor (APP) Expression Alters Synaptogenesis, Neurite Branching and Axonal Morphology of Hippocampal Neurons. **Neurochem Res**. 2019 Jun;44(6):1346-1355. doi: 10.1007/s11064-018-2512-0.

STEFFEN, J. et al. Expression of endogenous mouse APP modulates β -amyloid deposition in hAPP-transgenic mice. **Acta Neuropathol Commun**. 2017 Jun 20;5(1):49. doi: 10.1186/s40478-017-0448-2.

SUKSANGRAT, T.; PHANNASIL, P.; JITRAPAKDEE, S. miRNA Regulation of Glucose and Lipid Metabolism in Relation to Diabetes and Non-alcoholic Fatty Liver Disease. **Adv Exp Med Biol**. 2019;1134:129-148. doi: 10.1007/978-3-030-12668-1_7.

SUN, S. et al. Circulating mRNA and microRNA profiling analysis in patients with ischemic stroke. **Mol Med Rep**. 2020 Aug;22(2):792-802. doi: 10.3892/mmr.2020.11143.

TAJEDDINN, W. et al. 5-HT1B and other related serotonergic proteins are altered in APPswe mutation. **Neurosci Lett**. 2015 May 6;594:137-43. doi: 10.1016/j.neulet.2015.03.064.

TAN, C. C.; YU, J. T.; TAN, L. Biomarkers for preclinical Alzheimer's disease. **J Alzheimers Dis**. 2014;42(4):1051-69. doi: 10.3233/JAD-140843.



WALSH, A. D.; NGUYEN, L. T.; BINDER, M. D. miRNAs in Microglia: Important Players in Multiple Sclerosis Pathology. **ASN Neuro**. 2021 Jan-Dec;13:1759091420981182. doi: 10.1177/1759091420981182. Erratum in: **ASN Neuro**. 2022 Jan-Dec;14:17590914221106510.

WANG, F. et al. H19X-encoded miR-424(322)/-503 cluster: emerging roles in cell differentiation, proliferation, plasticity and metabolism. **Cell Mol Life Sci**. 2019 Mar;76(5):903-920. doi: 10.1007/s00018-018-2971-0.

WANG, T. W. et al. SIRT1-Mediated Expression of CD24 and Epigenetic Suppression of Novel Tumor Suppressor miR-1185-1 Increases Colorectal Cancer Stemness. **Cancer Res**. 2020 Dec 1;80(23):5257-5269. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-19-3188.

WILLIAMSON, J.; GOLDMAN, J.; MARDER, K. S. Genetic aspects of Alzheimer disease. **Neurologist**. 2009 Mar;15(2):80-6. doi: 10.1097/NRL.0b013e318187e76b.

YAMAZAKI, Y. et al. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: pathobiology and targeting strategies. **Nat Rev Neurol**. 2019 Sep;15(9):501-518. doi: 10.1038/s41582-019-0228-7.

ZHANG, Y. et al. Amyloid β -based therapy for Alzheimer's disease: challenges, successes and future. **Signal Transduct Target Ther**. 2023 Jun 30;8(1):248. doi: 10.1038/s41392-023-01484-7.