

**UNIVERSIDADE ESTADUAL NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO**

**Análise transcriptômica de lncRNAs (*long non-coding* RNAs) na doença de  
Alzheimer**

**BIANCA DE MATOS MOREIRA**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ**

**MARÇO 2022**

**Análise transcriptômica de lncRNAs (*long non-coding* RNAs) na doença de  
Alzheimer**

**BIANCA DE MATOS MOREIRA**

**Dissertação apresentada ao Centro de  
Biotecnologia e Biociências da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro  
– como parte dos requisitos para a obtenção  
do título de Mestre em Biociências e  
Biotecnologia na Área de Concentração em  
Biologia Molecular e Biotecnologia.**

**Orientador: Prof. Dr. Álvaro Fabrício Lopes Rios**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO  
CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
MARÇO 2022**

## FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

M838

Moreira, Bianca de Matos.

Análise transcriptômica de lncRNAs (*long non-coding* RNAs) da doença de Alzheimer / Bianca de Matos Moreira. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2022.

73 f.

Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2022.

Orientador: Alvaro Fabricio Lopes Rios.

1. Alzheimer. 2. lncRNAs. 3. Epigenética. 4. Transcriptômica. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570

**BIANCA DE MATOS MOREIRA**

**Análise transcriptômica de IncRNAs (*long non-coding RNAs*) na  
Doença de Alzheimer**

Dissertação apresentada ao Centro de  
Biotecnologia e Biociências da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense – Darcy  
Ribeiro, como parte das exigências para  
obtenção do título de Mestre em Biociências  
e Biotecnologia na Área de Concentração em  
Biologia Molecular e Biotecnologia.

**Aprovada em 02 de março de 2022**

**BANCA EXAMINADORA**

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** LUCIANA DE ANDRADE AGOSTINHO  
Data: 25/05/2022 13:23:43-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

---

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Luciana Andrade Agostinho – UNIFAMINAS**



---

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Anna Lvovna Okorokova Façanha – UENF**



---

**Prof. Dr. Victor Martin Quintana Flores – UENF**



---

**Prof. Dr. Álvaro Fabrício Lopes Rios – UENF (Orientador)**

## DEDICATÓRIA

*Ao meu irmão, **Emanuel** (in memoriam), pois através da vida dele e da doença que o acometeu meus olhos se abriram para o caminho da pesquisa e da epigenética. Ele foi e sempre será a minha fonte inspiração e a razão pela qual eu continuo resiliente e persistente.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus pelo dom da vida e por sempre ter suprido todas as minhas necessidades.

Agradeço a Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro por ter aberto as portas para a realização de um sonho. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa que possibilitou dois anos de formação acadêmica de qualidade. Agradeço aos professores que, junto aos alunos, reinventaram as aulas nesse período pandêmico e por terem realizado-as com tanto esforço e dedicação.

Agradeço ao meu orientador, Álvaro Fabrício, pela paciência, pelos estímulos, pelas reuniões e ligações que sempre objetivavam extrair o melhor de mim, assim como elevar meu nível como mestranda e cientista. Também o agradeço pelo lado humano que demonstrou e pelas palavras de apoio nos momentos necessários.

Agradeço aos meus colegas do LBT (Laboratório de Biotecnologia) que, mesmo à distância, se fizeram presentes e se dispuseram a ensinar e aprender em equipe. Em especial, agradeço ao Márcio Valeriano; ele se tornou meu braço direito e me socorreu todas as vezes em que precisei.

Agradeço à minha mãe, Lussandra, por sempre ter encorajado os meus sonhos e não apenas acreditado na minha capacidade, como também por ter me incentivado todos os dias a continuar e persistir. Ao meu Pai, Leandro, por ter investido nos meus estudos desde pequena e por se orgulhar de cada conquista. Ao meu irmão Leandro Gustavo, por alegrar os dias difíceis e desestimuladores.

Agradeço ao meu professor de História do ensino médio, Randolpho Radsack por ter me apresentado o caminho da pesquisa desde então. À minha orientadora, professora e amiga do Trabalho de Conclusão de Curso da Graduação por me incentivar e acreditar que o conhecimento pode transformar não só vidas, como o mundo.

Agradeço a todos os meus amigos que foram compreensíveis quando precisei me ausentar e por terem sido fonte de forças quando as minhas já estavam esgotadas. Agradeço especialmente ao Altivo por ter ouvido minhas lamúrias e me apoiado na etapa final.

Este é apenas o começo de toda a minha trajetória e por isso eu digo Ebenézer! Até aqui me ajudou o Senhor.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS .....	iii
LISTA DE FIGURAS .....	v
LISTA DE TABELAS .....	vii
RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	ix
1. JUSTIFICATIVA .....	1
2. INTRODUÇÃO .....	2
2.1 Genética e epigenética em transtornos mentais .....	3
2.2 A doença de Alzheimer .....	5
2.2.1 Mecanismos fisiopatológicos da doença de Alzheimer.....	6
2.2.2 Genética e Biologia Molecular da doença de Alzheimer.....	8
2.2.2.1 O Gene <i>APP</i> .....	9
2.2.2.2 O Gene <i>APOE</i> .....	10
2.2.2.3 Os Genes <i>PSEN1</i> e <i>PSEN2</i> .....	10
2.2.3 Diagnóstico da doença de Alzheimer .....	11
2.2.3.1 Sistema de Braak Braak.....	12
2.3 RNAs não codificadores de proteínas ( <i>Non-coding RNAs</i> - ncRNAs).....	13
2.3.1 RNAs longos não codificadores de proteínas ( <i>Long non-coding RNAs</i> - lncRNAs).....	13
2.3.1.1 lncRNAs na Doença de Alzheimer.....	14
3. OBJETIVOS .....	16
3.1 Objetivo geral.....	16
3.2 Objetivos específicos .....	16
4. METODOLOGIA.....	17
4.1 Obtenção e manipulação dos dados de RNA-seq .....	17
4.2 Identificação de lncRNAs (lncRNAs) diferencialmente expressos na doença de Alzheimer .....	17
4.3 Identificação de redes de co-expressão gênica mRNA-lncRNA e identificação de possíveis vias biológicas associadas. ....	18
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19

5.1 Análise da Expressão Diferencial dos lncRNAs em pacientes portadores da Doença de Alzheimer .....	19
5.2 Genes diferencialmente expressos em sangue e hipocampo.....	29
5.3 Correlação de lncRNAs diferencialmente expressos com via biológicas conhecidas.....	32
7. CONCLUSÃO.....	40
8. REFERÊNCIAS.....	41
9. APÊNDICE A.....	53



## LISTA DE ABREVIATURAS

- AECII Células Alveolares Epiteliais do Tipo II
- APP Proteína Precursora Amilóide
- APBB2 Membro 2 da Família B de Ligação de Proteínas Precursoras Amiloide Beta
- ApoE Apolipoproteína E
- A $\beta$  Peptídeo Beta amilóide
- A $\beta$ 42 Aminoácido 42 do Peptídeo Beta Amilóide
- A $\beta$ 40 Aminoácido 40 do Peptídeo Beta Amilóide
- $\beta$ APP Precursor da proteína Beta Amilóide
- BACE1 Beta secretase 1
- BAM *Binary Alignment/Map* (Mapa de Alinhamento Binário)
- CERAD *Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease*
- CNTN6 Contactina 6
- DA Doença de Alzheimer
- DAIP Doença de Alzheimer de Início Precoce
- DAIT Doença de Alzheimer de Início Tardio
- DEGs *Differentially expressed genes* (Genes diferencialmente expressos)
- ELA Esclerose Lateral Amiotrófica
- eRNA *enhancer* RNA
- FAM46C Família com similaridade de sequência 46 – membro C
- GPCRs Receptores Acoplados à Proteína G
- HCC Carcinoma Hepatocelular
- IHQ Imunohistoquímica
- KA Ácido Caínico
- lncRNA *long noncoding* RNA (RNA não codificador longo)
- LAD Adenocarcinoma de pulmão
- LTL Lobo temporal lateral
- MCH Hormônio Concentrador de Melanina
- miRNA microRNA
- MRPL57-9 Proteína ribossomal mitocondrial L57

- NDM29 Marcador de diferenciação do neuroblastoma 29
- NCBI *National Center for Biotechnology Information*
- ncRNA noncoding RNA
- PACAP Polipeptídeo Ativador da Adenilato Ciclase Pituitária
- PC12 Linhagem celular derivada de um feocromocitoma da medula adrenal de rato
- PDK4 Piruvato desidrogenase quinase isoenzima 4
- PFC Prefrontal cortex
- PSEN1 Presinilina 1
- PSEN2 Presinilina 2
- RM Ressonância Magnética
- RNA Ácido Ribonucleico
- SAM Sequence Alignment/Map
- SNC Sistema Nervoso Central
- SRA Sequence Read Archive
- TAU Gene codificador da proteína TAU
- TC Tomografia Computadorizada
- TGF $\beta$  Fator Transformador do Crescimento Beta
- TSH Hormônio Tireo-estimulante
- rRNA RNA ribossômico
- tRNA RNA transportador
- snoRNA Pequenos RNAs nucleolares
- SORL1 Receptor 1 relacionado a sortilina
- VEGF Fator de crescimento vascular endotelial

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Associação entre os genes, suas funções e o desenvolvimento dos mecanismos fisiopatológicos presentes em pacientes portadores da DA .....7
- Figura 2: Heatmap da anotação genômica de mRNAs (SeqMonk v 1.48.0) diferencialmente expressos ( $\log_2 \text{fold change} > 2 / p < 0,05$ ) em amostras de Córtex pré-frontal (PFC) analisadas (estágio : braak 1-2 - barra azul; braak 3-4 - barra vermelha; braak 5-6 - barra verde). Dados representados em  $\log_2$  RPKM. 20
- Figura 3: Heatmap representando genes codificadores lncRNAs (LNCipedia) diferencialmente expressos ( $\log_2 \text{fold change} > 2 / p < 0,05$ ) em amostras de Córtex pré-frontal (PFC) analisadas (estágio : braak 1-2 - barra azul; braak 3-4 - barra vermelha; braak 5-6 - barra verde). Dados representados em  $\log_2$  RPKM. 20
- Figura 4: Heatmap representando genes codificadores lncRNAs (LNCipedia) diferencialmente expressos ( $\log_2 \text{fold change} > 2 / p < 0,05$ ) em amostras de Lobo Temporal Lateral (LTL) analisadas (controle : indivíduos saudáveis /braak 1-2 - barra vermelha; AD braak 5-6 - barra azul). Dados representados em  $\log_2$  RPKM. ....22
- Figura 5: Heatmap representando genes codificadores lncRNAs (LNCipedia) diferencialmente expressos ( $\log_2 \text{fold change} > 2 / p < 0,05$ ) em amostras de LTL analisadas (controle: indivíduos saudáveis /braak 1-2 - barra vermelha; AD braak 5-6 - barra azul). Dados representados em  $\log_2$  RPKM. .... 22
- Figura 6: lncRNAs diferencialmente expressos no Córtex Pré Frontal (PFC) e Lobo Temporal Lateral (LTL) em pacientes portadores da Doença de Alzheimer. No PFC foram identificados 1871 lncRNAs e no LTL 1055 lncRNAs;  $\log_2 \text{fold change} > 2$  56 lncRNAs selecionados no PFC e 151 lncRNAs selecionados no LTL.....23
- Figura 7: Descrição funcional dos lncRNAs com caracterização em Alzheimer em banco de dados. De 186 lncRNAs caracterizados em banco de dados de DA, 19 possuíam classificação segundo a literatura. Quanto à caracterização funcional, 2 exerciam a função de esponja de miRNA, 3 de enhancer, 3 de promotor/*enhancer* e esponja para miRNA, 11 de promotor/*enhancer*.....23

- Figura 9: Redes de interação dos genes coexpressos dos módulos M1-M5 identificados na análise de Córtex Pré Frontal (CPF) (DA x CTRL) pelo WebCEMiTool ..... 33
- Figura 10: Redes de interação dos genes coexpressos dos módulos M1-M3 identificados na análise de Lobo Temporal Lateral (LTL) (DA x CTRL) nos resultados da análise pelo WebCEMiTool..... 35
- Figura 11: Heatmap dos pares de mRNA/lncRNA encontrados nos resultados do webCEMiTool. (A) Córtex Pré Frontal (CPF) analisadas (estágio: braak 1-2 - barra azul; braak 3-4 - barra vermelha; braak 5-6 - barra verde). (B) Lobo Temporal Laterla (LTL) analisadas (controle: indivíduos saudáveis /braak 1-2 - barra vermelha; AD braak 5-6 - barra azul). Dados representados em log<sub>2</sub> RPKM..... 35
- Figura 12: Vias comuns de distúrbios associados ao envelhecimento. O risco de doença de Alzheimer (DA) em idosos é aumentado por outras comorbidades associadas ao envelhecimento, incluindo obesidade, diabetes e comprometimento cardiovascular. Estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e inflamação crônica observadas nessas condições também são algumas das causas importantes da DA. Fonte: Pugazhenth; Qin; Reddy, 2017 (Adaptado pelo autor). ..... 37

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descrição amostral dos dados utilizados no presente estudo para a realização das análises de RNA-seq.....	19
Tabela 2: Genes diferencialmente expressos no hipocampo e no sangue periférico e suas respectivas funções segundo literatura .....	27
Tabela 3: Pares de mRNA/lncRNA incluindo módulo, coordenada cromossômica e característica estrutural do lncRNA. ....	35

## RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é considerada uma das principais causas de demência no mundo. Alguns mecanismos fisiopatológicos sobre ela já foram cientificamente elucidados, como o acúmulo de placas beta amilóides e emaranhados neurofibrilares. Em adição aos dados já conhecidos, os lncRNAs (*long noncoding RNA*), que podem exercer funções de regulação gênica pré e pós-transcricionais têm sido associados com o desenvolvimento da DA, constituindo uma classe de biomoléculas importantes na etiologia dessa doença e como marcadores moleculares que podem auxiliar no diagnóstico dessa patologia. O objetivo do presente estudo foi caracterizar lncRNAs diferencialmente expressos no transcriptoma de pacientes portadores da Doença de Alzheimer. Foram utilizados dados de RNA-seq obtidos da plataforma SRA vinculada ao NCBI. As coordenadas dos lncRNAs e genes codificadores de proteínas foram obtidas do banco de dados LNCipedia 5.2 e de anotações internas do software SeqMonk v 1.48.0. Os dados de RNA-seq alinhados e quantificados de cada transcrito foram analisados utilizando o software SeqMonk v. 1.48.0. Foram identificados padrões de co-expressão de lncRNAs e genes codificadores de proteínas com expressão gênica diferencial. A possível correlação dos lncRNAs diferencialmente expressos encontrados foi investigada com base em informações do banco de dados NIAGADS. Foram identificados 207 lncRNAs diferencialmente expressos (DE-lncRNAs) em pacientes com Alzheimer; estes foram associados a lncRNAs diferencialmente expressos em loci de genes associados à DA e identificados padrões de co-expressão de lncRNAs e genes codificadores de proteínas associados a possíveis vias neuroinflamatórias associadas à DA. Além disso, foi identificado um lncRNA expresso no PFC e LTL, o *lnc-MRPL57-9* e o fato dele ser o único expresso em ambos os tecidos reforça a necessidade de estudos futuros que caracterizem a função do mesmo na DA.

## ABSTRACT

Alzheimer's disease is considered one of the main causes of dementia in the world. Some pathophysiological mechanisms about it have already been scientifically elucidated, such as the accumulation of amyloid beta plaques and neurofibrillary tangles. In addition, lncRNAs (long non-coding RNAs or non-coding RNAs), which can exert pre and post-transcriptional gene regulatory functions, have been associated with the development of AD, constituting a class of important biomolecules in the etiology of this disease and as molecular markers that can help in the diagnosis of this pathology. The aim of the present study is to characterize lncRNAs differentially expressed in the transcriptome of patients with Alzheimer's Disease. In this study, it was used RNA-seq data obtained from the SRA platform linked to the NCBI. Alignment data were analyzed using SeqMonk v. 1.48.0. Expression parameters of lncRNAs co-expressed with protein-coding genes with a differential expression pattern were evaluated. The genomic coordinates of lncRNA genes and transcripts obtained from the LNCipedia 5.2 database and the UCSC genome browser and mapped against genomic loci coordinates of Alzheimer's disease-associated described in the NIAGADS database. We identified 207 differentially expressed lncRNAs (DE-lncRNAs) in Alzheimer's patients; these were associated with differentially expressed lncRNAs at AD-associated gene loci and identified patterns of co-expression of lncRNAs and protein-coding genes associated with possible altered AD neuroinflammatory pathways. In addition, an lncRNA expressed in PFC and LTL was identified (*lnc-MRPL57-9*) and the fact that it is the only one expressed in both tissues reinforces the need for future studies that characterize its function in AD.

## 1. JUSTIFICATIVA

A doença de Alzheimer (DA) é uma desordem neurodegenerativa e irreversível, caracterizada pelo comprometimento distúrbios neurológicos de aspectos funcionais, podendo ser originada pela influência de fatores genéticos e/ou ambientais (ARMSTRONG, R., 2019). Atualmente, a demência se apresenta como a sétima causa de morte entre todos os países, sendo que 75% de todos os casos não são diagnosticados no mundo, aumentando para 90% nos países de renda média e baixa (GAUTHIER, S., 2021).

O diagnóstico para a doença ainda não é bem conceituado e comprobatório pelo clínico, o que gera uma barreira para a realização do mesmo (GAUTHIER, S. *et al*, 2021). Contudo, a existência de testes que avaliam o estado mental, a memória do paciente, a concentração e as suas habilidades em conjunto com exames de imagem como Tomografia Computadorizada (TC) e Ressonância Magnética (RM), conjecturam o diagnóstico final para a DA. Entretanto, o mesmo só é confirmado após a realização da análise *post-mortem* do tecido nervoso (APS, 2014).

Nesse sentido, existe uma escassez generalizada de biomarcadores preditivos ou com valor diagnóstico para a DA, bem como sobre a elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos. Estudos realizados comprovam o envolvimento de lncRNAs (*long noncoding RNAs*) à ocorrência da DA; contudo, pouco se conhece sobre a função dos mesmos nessa desordem (IDDA, M.L. *et al*, 2018; DINGFENG, LI, 2020).



## 2. INTRODUÇÃO

Segundo o Relatório Mundial de Alzheimer (2021), pressupõe-se que a cada 3,2 segundos é diagnosticado um novo caso de demência, sendo a doença de Alzheimer (DA) a causa mais comum deste déficit cognitivo (GAUTHIER, S. *et al*, 2021). Afeta cerca de 5% dos indivíduos com mais de 70 anos, sendo 25% de todos os casos familiares (dois ou mais indivíduos afetados dentro de uma família). A DA de início precoce (DAIP) representa aproximadamente 1-5% de todos os casos de doença de Alzheimer, com uma prevalência de 41,2 por 100.000 indivíduos com idade entre 40-59 anos. Aproximadamente 1% dos indivíduos com doença de Alzheimer tem uma forma genética. No entanto, estima-se que 40-80% dos indivíduos com (DAIP) e história familiar de doença de Alzheimer têm uma variante patogênica em APP, PSEN1 ou PSEN2. Embora menos comum, aproximadamente 6% dos indivíduos com DAIP e sem histórico familiar podem ter uma variante patogênica em um desses genes. (RIBEIRO, H. *et al.*, 2021).

A fisiopatologia da doença de Alzheimer possui algumas hipóteses pré-estabelecidas como a cascata amiloidal, a perda funcional, a inflamatória, a da disfunção mitocondrial e a colinérgica (PEÇANHA, M., NERI, V, 2007). Estudos recentes demonstram que fatores ambientais têm sido considerados como potencializadores para o desenvolvimento da DA por meio da acentuação das hipóteses citadas anteriormente (DINGFENG LI, 2020).

Nesse contexto, os fatores epigenéticos podem atuar como elo entre a exposição a fatores externos e as mudanças moleculares associadas ao desenvolvimento da DA (FENOGLIO, C. *et al*, 2018). A epigenética é um ramo da biologia que estuda alterações na função gênica que são potencialmente herdáveis e não estão associadas a mudanças nas sequências de nucleotídeos do DNA (BOLLATI, V., BACCARELLI, A., 2010). Entre os principais fatores epigenéticos associados a regulação gênica, encontram-se a metilação do DNA, as modificações covalentes em histonas e a ação dos RNAs não codificadores de proteínas (*noncoding RNAs* - ncRNAs) (INBAR-FEIGENBERG, M., *et al*, 2013). A ação dos ncRNAs têm sido associados à etiologia da doença de Alzheimer, no entanto, considerando o número estimado de transcritos de ncRNAs (pequenos e grandes), pouco ainda foi desvendado sobre a ação dos mesmos no desenvolvimento da DA (DINGFENG, LI *et al*, 2020).

Portanto, fatores epigenéticos como os ncRNAs (*non -coding RNAs*) têm emergido como possíveis elementos no desenvolvimento da etiologia e fisiopatologia de diversas doenças, principalmente as que cursam entre os transtornos mentais.

## **2.1 Genética e epigenética em transtornos mentais**

Em geral, a maioria das células de um indivíduo possui o mesmo material genético, contudo, suas características fenotípicas se distinguem pela necessidade de expressão gênica em diferentes órgãos e tecidos, gerando padrões divergentes de expressão gênica e fenótipos celulares específicos (BROOKES & SHI, 2014).

A epigenética é uma área da biologia definida pelo estudo das modificações na regulação gênica, de maneira que não ocorram mudanças nas sequências de bases nucleotídicas que possuem um potencial de herdabilidade (seja mitótica ou meiótica) (GOLBABAPOUR, S. *et al*, 2011).

Em suma, os mecanismos de regulação gênica utilizam mecanismos epigenéticos, de maneira que estes promovem regulação tempo e espaço específicas da atividade de cada gene através das gerações celulares (WOLFFE, A.P., GUSCHIN, D., 2000; BOLLATI, BACCARELLI, A., 2010). Modificações nesses mecanismos que atuam no controle da expressão gênica podem contribuir para o desenvolvimento de uma gama de doenças crônicas, como diabetes, hipertensão e até mesmo transtornos mentais (BROOKES & SHI, 2014).

As marcas epigenéticas que possuem seus mecanismos mais elucidados são a metilação do DNA e as modificações covalentes de histonas (DAY & SWEATT, 2011). Essas marcas moleculares são capazes de serem transmitidas entre células de um mesmo organismo, assim como podem apresentar uma herança transgeracional. Sua interferência na expressão gênica é estabelecida por padrões diferenciais de condensação da cromatina no qual os genes se encontram, coordenando, assim, a transcrição dos mesmos (GIBNEY, E. R., NOLAN, C. M, 2010).

A relação entre o comportamento e funcionamento do genoma com o ambiente que o cerca é mediada em grande parte pelos mecanismos epigenéticos (ZHANG, L., LU, Q., CHANG, C., 2020). Nesse cenário, sinais externos ao genoma

podem interferir direta ou indiretamente nos *status* de condensação da cromatina influenciando conseqüentemente a regulação da transcrição gênica (BROOKES & SHI, 2014).

Um crescente número de evidências sustenta a hipótese de que os mecanismos de regulação epigenética estão intimamente relacionados a fatores ambientais intra e extra corpóreos aos quais as células de um indivíduo estão expostas (GOLBABAPOUR, S. *et al.*, 2011). Essa interação ambiente – epigenótipo tem sido relacionada à manifestação da variação fenotípica no período do desenvolvimento pré e pós-natal, podendo o efeito da mesma ser manifesto por toda a vida de um indivíduo (ROBINSON, A.J., NESTLER, E.J., 2011). Esse tipo de interação pode estar correlacionada com a etiologia de diversas doenças como consequência da exposição de um indivíduo a diferentes fatores ambientais, contudo, essa correlação parece variar entre diferentes indivíduos (BROOKES & SHI, 2014).

Na área da neurociência, as pesquisas sobre os fenômenos epigenéticos têm ocorrido de maneira crescente por meio do uso de modelos animais associados a estudos epidemiológicos e genéticos (ROBINSON, A.J., NESTLER, E.J., 2011). Portanto, informações importantes têm sido geradas, como: um estudo dos sobreviventes de “*Dutch Hunger Winter*”, ocorrida no período de 1944-1945, demonstrou que os mesmos foram expostos à privação de alimento no período pré-natal, levando a conclusão de que ocorre uma associação entre a desnutrição e uma maior vulnerabilidade ao desenvolvimento da esquizofrenia através de alterações específicas no gene *IGF2* (codifica o fator de crescimento semelhante à insulina 2), essencial no desenvolvimento pré-natal. Essas alterações foram identificadas pelos pesquisadores como derivadas de alterações epigenéticas (FITZGERALDM, D., ROSE, N., SINGH, I., 2016).

Além disso, um aspecto novo e importante do controle epigenético está surgindo com base em estudos recentes dos mecanismos moleculares no sistema nervoso central: a presença de alterações epigenéticas no cérebro adulto e não apenas nos recém-nascidos (SWEATT, J.D., 2009). A hipótese dos trabalhos é de que os mecanismos epigenéticos desempenhem um papel crítico na regulação das funções neurais também no cérebro adulto, de forma que as influências ambientais sobre a ação e expressão dos genes permanecem em andamento ao longo da vida (FREITAS-SILVA, L.R., ORTEGA, F., 2016).

Essa suposição representa a tentativa de entender, baseando-se em pesquisas moleculares, como a célula neuronal pode apresentar dois mecanismos aparentemente opostos: a capacidade de manter modificações estáveis (a memória celular) e a capacidade de exibir modificações de curto prazo (a plasticidade neuronal). Tal suposição confere ainda maior abertura à determinação genética entendida como herança biológica do indivíduo, estendendo a períodos posteriores da vida a intensa interação entre genes e ambiente presumida como característica dos períodos mais precoces do desenvolvimento (BORELLI, E. *et al*, 2008).

Além da esquizofrenia, estudos de diferentes grupos de pesquisa de todo o mundo têm identificado genes associados aos transtornos mentais que são susceptíveis a sofrerem alterações epigenéticas (epimutações) (GUILLENBURGOS, H.F., GUITERREZ-RUIZ, K., 2018; OKASAKI, S., NUMATA, S., OTSUKA, I. *et al*, 2020). Alguns genes específicos têm sido relacionados à etiologia dos transtornos mentais, como por exemplo, *CACNB2* e o *CACNA1C* - correlacionados com o transtorno bipolar e a esquizofrenia (GORDOVEZ, F.J.A., MCMAHON, F.J., 2020), e *APOE*, *PSEN1*, *PSEN2*, *APP* se encontram entre os genes que possuem maior correlação com as demências, sejam elas degenerativas ou não, ressaltando a doença de Alzheimer (DA) (FRIDMAN *et al*, 2004).

## **2.2 A doença de Alzheimer**

A doença de Alzheimer é caracterizada como uma doença neurodegenerativa e progressiva, de início precoce (entre 30 e 65 anos) ou tardio. Os sintomas mais comuns apresentados pelos pacientes são a perda de memória, déficit cognitivo e a desorientação, seguidos de deficiência na linguagem podendo ser acompanhados de distúrbios comportamentais (SERENIKI, A.; VITAL, M.A.B.F, 2008).

O número elevado de pacientes diagnosticados com DA está diretamente relacionado ao envelhecimento da população em todo o mundo, tendo em vista que a maioria leva à morte neuronal, gerando demência (SERENIKI, A.; VITAL, M.A.B.F, 2008). Nos países desenvolvidos como os Estados Unidos e os países Europeus, essa patologia é caracterizada como a terceira causa de mortalidade, antecedida apenas pelo câncer e doenças crônicas - obesidade, diabetes e hipertensão (FRIDMAN, *et al*, 2005). Apesar do Brasil ser definido como um país subdesenvolvido, seu crescente envelhecimento da população ultrapassa a

porcentagem global, podendo, posteriormente, classificar a DA como uma das principais causas de mortes em idosos no país (UNITED NATIONS, 2017).

Existe um déficit de estudos de prevalência da Doença de Alzheimer no Brasil; contudo, algumas pesquisas realizaram associação entre questões sociais como gênero e grau de alfabetização em determinadas regiões do país. Segundo estas, mulheres são acometidas mais que os homens devido a proporção do sexo feminino em relação ao masculino ser maior (TEIXEIRA, J. B. *et al*, 2015). Houve também um índice maior de pacientes com a patologia que possuíam baixo grau de alfabetização, o que gera uma dificuldade de trabalhos estimulantes para a cognição e memória, como por exemplo a leitura (BOFF, M.S., SEKYIA, F.S., BOTTINO, C.M.C, 2015).

Segundo a evolução progressiva da doença, a DA é classificada em três estágios: leve, moderado e grave (BARNES, 2011): no estágio leve ocorre um maior comprometimento da memória recente; no estágio as áreas afetadas são a da fonoaudiologia, além disso, a personalidade pode sofrer alterações, como agressividade e irritabilidade, também se faz presença de delírios e alucinações; no estágio grave existe um maior comprometimento tanto na memória de longo prazo, assim como manifesta dificuldades em terminar frases e grandes problemas de comunicação verbal. Ocorre perda total das atividades de vida diária, além da aparência fragilizada e da extrema irritabilidade.

### **2.2.1 Mecanismos fisiopatológicos da Doença de Alzheimer**

Alguns mecanismos fisiopatológicos da DA já foram relatados e têm sido elucidados como a agregação de placas beta-amilóides senis ou os emaranhados neurofibrilares, gerados pelo acúmulo da proteína TAU fosforilada nos neurônios, em sua grande maioria devido a mutações e polimorfismos, como demonstra a Figura 1 (CONGDON. E.E., SIGURDSSON, E., 2018).

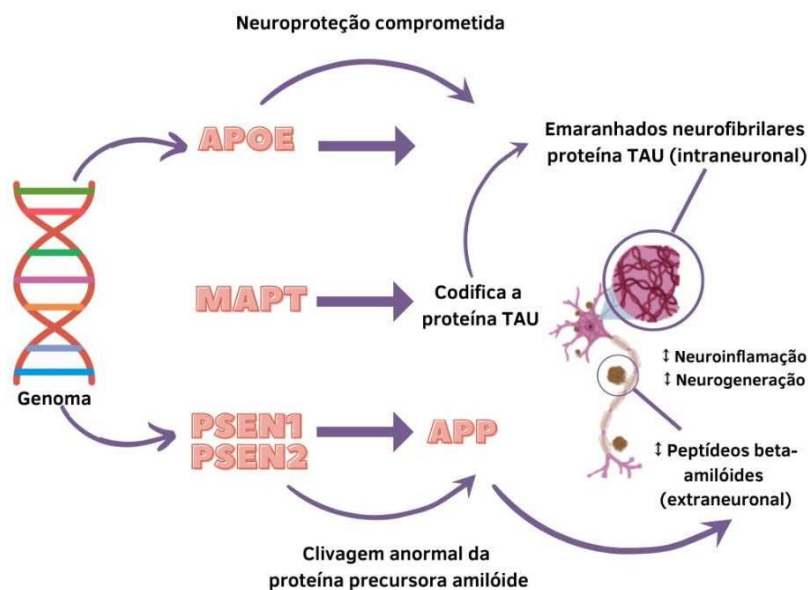


Figura 1: Associação entre os genes, suas funções e o desenvolvimento dos mecanismos fisiopatológicos presentes em pacientes portadores da DA.

A proteína amilóide possui função protetora do sistema nervoso central, combatendo a entrada de microrganismos, como os vírus e as bactérias. Esta é codificada pelo gene *APP*, localizado no cromossomo 21. Quando clivadas, essas proteínas se tornam peptídeos beta-amiloides de tamanho reduzido, que podem gerar placas localizadas entre as sinapses acarretando em uma dificuldade na comunicação interneuronal (BUSCH, M.A; HYMAN, B.T, 2020).

Estudos científicos analisaram neurônios *post-mortem* de pacientes com DA e notaram que neurônios afetados apresentavam anormalidades no citoesqueleto, principalmente nos dendritos e nos corpos celulares dos neurônios. Essas anormalidades eram emaranhados neurofibrilares formados pela hiperfosforilação da proteína TAU - envolvida no processo de formação de microtúbulos e de transporte intracelular dos neurônios (CONGDON E.E., SIGURDSSON, E.M., 2018).

A análise histopatológica *post-mortem* de cérebros de pacientes com DA revelam, como previamente descrito por Alois Alzheimer (PHILIPSON *et al.*, 2010) a presença de alterações moleculares características as quais incluem os emaranhados neurofibrilares intracelulares compostos por agregados fibrilares da proteína tau hiperfosforilada e oxidada; e as placas senis ou neuríticas, as quais são constituídas por depósitos extracelulares de fibrilas de agregados amorfo do

peptídeo  $\beta$ -amilóide ( $A\beta$ ) (HAMDAME, M. *et al*, 2003; FORMAN, M.S. *et al*, 2004; MATTSON, M.P., 2004; SELKOE, D.J. e WALSH, D.M., 2004).

### 2.2.2 Genética e Biologia Molecular da Doença de Alzheimer

A Doença de Alzheimer de Início Precoce (DAIP) geralmente está associada à presença de histórico familiar com a mesma condição e com caráter autossômico dominante, enquanto na DA de início tardio não há causa mendeliana identificada (NUSSBAUM *et al.*, 2007). Existem três genes caracterizados e relacionados com a doença de Alzheimer, sendo eles: *APP*, *APOE*, *PSEN1* e *PSEN2*, como demonstra a Tabela 1.

Tabela 1: Genes e mutações envolvidas com a doença de Alzheimer de início precoce (DAIP).

Proteína/gene	Função	Mutação/Polimorfismo*
Apolipoproteína/ ApoE	Reparo de danos excessivos aos neurônios	E*4a
Proteína precursora amilóide/ APP	Crescimento neuronal	D678N
		c-209g
		E693G
		A692G
		V717I
		K670M
		D671L
Presenilina 1/S182, PS1	Processo inflamatório e processo de apoptose celular	A246E
		L424R
		M139V
		E280A
		L166P
		c-48t
Presenilina 2/STM-2, PS2, PEN2	Processo de neurodegeneração	c-4.752t
		Del éxon 9
		N141I
		D90N
		M139V
Proteína TAU/MAPT	Polimerização da tubulina, agregação de microtúbulos	T122R
		R406W

Fonte: LUCATELLI JF, *et al.*, 2009 (Adaptado pelo autor).

Os genes *APP*, *PSEN1* e *PSEN2* estão associados a idades variáveis de início e a penetrância é tipicamente dependente da idade. Acredita-se que a penetrância de *APP* seja de aproximadamente 100% no início dos anos 60, e a penetrância de *PSEN1* atinja aproximadamente 100% aos 65 anos (NUSSBAUM *et al.*, 2007; LUCATELLI *et al.*, 2008).

### 2.2.2.1 O Gene *APP*

O primeiro gene, localizado no cromossomo 21, codifica a proteína amiloide (transmembranar). A parte do gene codificador da proteína *APP* possui cerca de 18 *exons*, que podem sofrer *splicing* alternativo com recortes dos *éxons* 7, 8 e 15, originando 8 isoformas de transmembrana. Após sintetizadas, essas proteínas são transportadas para a superfície celular e são clivadas por três proteases diferentes:  $\alpha$ -secretase,  $\beta$ -secretase e  $\gamma$ -secretase. Aproximadamente 90% das proteínas *APPs* são clivadas pela  $\alpha$ -secretase, que dá origem a um produto não amiloidogênico, pois impede a formação de peptídeo  $A\beta$  (beta amiloide) ao clivar seu domínio. Diferentemente, quando a clivagem é realizada pelas proteases  $\beta$ secretase e  $\gamma$ -secretase, em geral 10%, há formação de peptídeo  $A\beta_{40}$ , que é atóxico porém amiloidogênico, ou  $A\beta_{42}$ , neurotóxico também amiloidogênico (NUSSBAUM *et al.*, 2007).

Em suma, o acúmulo do peptídeo neurotóxico ( $A\beta_{42}$ - composto por 42 aminoácidos) possui propriedade de agregação proteica na parte extraneuronal, resultando na formação de fibras amiloidais que levam às placas senis. Este fragmento possui característica mais amiloidogênica que a proteína original, agregando-se à parte extracelular dos neurônios, enquanto outros fragmentos intracelulares de *APP* se conectam a fatores de transcrição e são transportados para o núcleo, influenciando a transcrição. A regulação da degradação da proteína *APP* é dependente de um complexo protéico onde os principais componentes são as presenilinas, a nicastrina, entre outros (FRIDMAN, C. *et al.*, 2004).

As mutações no gene *APP* estão correlacionadas com casos de doença de Alzheimer de início precoce (DAIP). Existem mais de 20 diferentes mutações de troca de aminoácidos no gene *APP* e mais de 800 polimorfismos descritos em *introns*, além de 11 *exons*, sendo 7 destes troca de aminoácidos.



### 2.2.2.2 O Gene *APOE*

A apolipoproteína E (*ApoE*), é uma proteína plasmática constituída de diversas lipoproteínas de função estrutural, regulatória, auxiliando também na absorção, transporte e redistribuição do colesterol entre tecidos e órgãos. Por exercer esta última função, a Apolipoproteína E possui importante ressalva no reparo de danos demasiados de neurônios, atribuindo lipídeos (esfingomielina) aos axônios e regeneração das células de Schwann, restabelecendo assim as conexões sinápticas (LUCATELLI, *et al.*, 2008).

Na década de 90 ocorreu a associação entre uma região do cromossomo 19, que determina a produção da proteína ApoE, e a Doença de Alzheimer, o alelo  $\epsilon 4$ , tendo em vista que essa proteína foi encontrada em análises das placas senis e dos fusos neurofibrilares de portadores de DA – principalmente de início tardio (DAIT) (SAUNDERS *et al.*, 1993; ALMEIDA; SHIMOKOMAKI, 1997).

Acredita-se que devido a proteína ApoE  $\epsilon 4$  possuir alta compatibilidade com as placas senis, a mesma se relaciona de forma estável com o peptídeo  $\beta$  amiloide, agindo, portanto, através de dois possíveis mecanismos patogénéticos: afetando a taxa de fosforilação da proteína TAU, favorecendo a formação de fusos neurofibrilares, e alterando a homeostasia entre deposição e clivagem de  $\beta$  amilóide, elevando a produção e formação de placas amiloidais (ALMEIDA, 1997).

### 2.2.2.3 Os Genes *PSEN1* e *PSEN2*

O gene *PSEN1* codifica a presenilina 1, está localizado no cromossomo 14, enquanto o *PSEN2* se encontra no cromossomo 1 codifica a presenilina 2. Ambas proteínas não possuem funções esclarecidas, porém acredita-se que as mutações destes genes parálogos estejam relacionadas a alterações de clivagem da proteína precursora amilóide, ampliando a produção de placas  $\beta$ -amilóide, observado principalmente em casos de DA de início precoce. Contudo, sabe-se que presenilina 1 está presente no processo inflamatório observado na placa amilóide (placa senil), podendo interferir no processo de apoptose, enquanto a presenilina 2 está ligada ao processo de neurodegeneração. Segundo Nussbaum, “adicionalmente, há algumas evidências de que a presenilina 1 é um cofator proteico crítico da Y-secretase.” (LUCATELLI *et al.*, 2008).

Uma das principais diferenças entre as presenilinas, é a idade de início, uma vez que a *PSEN2* é muito variável em uma família, já que a mutação pode ser

transmitida para várias gerações assintomáticas e desenvolver a produção de peptídeo A $\beta$ 42 em descendentes até mesmo do octogenário portador assintomático. Dessa maneira, pode-se concluir que a Presenilina 1 desenvolve a aparição dos sintomas na faixa dos 35 aos 60 anos, enquanto a Presenilina 2 na faixa dos 40 aos 85 anos de idade, sendo responsáveis por 30% a 50% dos casos de DA de herança dominante e de início precoce (NUSSBAUM *et al.*, 2007).

### 2.2.3 Diagnóstico da Doença de Alzheimer

O maior desafio na área da neurologia tem sido revelar precocemente as alterações cerebrais indicativas da DA, tendo em vista que os mecanismos envolvidos na sua patogênese ainda não foram totalmente elucidados, além do seu complexo diagnóstico e carência de tratamento. A degeneração cerebral primária e consequente declínio das funções intelectuais apresentam características neuropatológicas e neuroquímicas próprias e complexas (VALENTE, *et al.*, 2011; KARRAN, E., STROOPER, B., 2016; ANDRADE-MORAES, *et al.*, 2013; CASTELLANI e PERRY, 2014).

Embora a análise histológica do tecido cerebral *post mortem* permaneça necessária para o diagnóstico definitivo da DA, a combinação da avaliação clínica, com critérios preestabelecidos e com os exames de imagem (TC e RM) permitem um diagnóstico possível ou provável, acurado em 80 a 90% dos casos (CAÇÃO, *et al.*, 2007; KARRAN, E., STROOPER, B., 2016; BALLARD, 2011).

Desde a sua proposta, em 1984, o Instituto Nacional de Neurologia e a Associação de Doenças da Comunicação e Doença de Alzheimer (NINCDS-ADRDA) estabeleceram critérios que combinam padrões clínicos e neuropatológicos para atribuir diagnósticos de DA possível, provável e definitivo (BLENNOW, *et al.*, 2006; BALLARD, 2011; KARRAN, E., STROOPER, B., 2016).

Uma nova revisão desta classificação buscou melhorar a especificidade do diagnóstico ao incluir os biomarcadores genéticos e os biomarcadores adicionais que auxiliam no aumento da especificidade do diagnóstico que inclui várias medições do líquido cefalorraquidiano, sangue e de neuroimagem (TEIPEL, 2013; REITZ e MAYEUX, 2014; CASTELLANI e PERRY, 2014).

O exame clínico busca informações acerca da história prévia do paciente e seus familiares, como doenças preexistentes, traumas, cirurgias, uso de álcool e drogas lícitas e ilícitas (BLENNOW *et al.*, 2006; BALLARD, 2011). O físico visa

identificar déficits neurológicos focais, dificuldade na marcha, lentificação, tremores entre outros sinais que possam contribuir para um diagnóstico diferencial, tendo em vista que a presença das placas e emaranhados não exclui a possibilidade de outras lesões simultâneas e que também podem acarretar para o desenvolvimento da DA (HYMAN *et al.*, 2012).

A avaliação cognitiva é realizada com aplicação de escalas e exame mental para triagem e avaliação mais breve, até testes neuropsicológicos específicos mais extensivos como o *Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Diseases a Mttis Dementia Rating Scale* e o CAMDEX (APRAHAIMAN, 2009; KARRAN, E., STROOPER, B., 2016). Com relação aos exames laboratoriais, recomenda-se a dosagem do hormônio tireo-estimulante (TSH) e nível sérico da vitamina B12 para a exclusão de outras doenças que possuem sintomatologias semelhantes a da DA.

A análise do líquido cefalorraquidiano para proteína TAU e peptídeo A $\beta$  só deve ser realizada nos casos de demência pré-senil ou apresentação de curso atípico da doença. Os exames de neuroimagem, como a TC e a RM, são utilizadas primordialmente para afastar outras causas de demências (APRAHAIMAN, 2009; CARAMELLI *et al.*, 2011; VANDENBERGHE *et al.*, 2013).

Contudo, não existem marcadores específicos na investigação laboratorial e de imagens da DA, embora alguns achados possam dar suporte ao diagnóstico clínico (CASTELLANI e PERRY, 2014). Os marcadores moleculares da doença têm sido pesquisados em fluídos e tecidos biológicos, particularmente a detecção de peptídeo A $\beta$  e suas frações e da proteína TAU hiperfosforilada por métodos que variam de imunohistoquímica (IHQ) a espectrometria de massa (CARAMELLI *et al.*, 2011). Além disso, estudos recentes têm associado a expressão alterada dos ncRNAs na DA aos mecanismos fisiopatológicos já conhecidos, fazendo com que os mesmos assumam papel de biomarcadores preditivos para a doença (DINGFENG, LI *et al.*, 2020).

### **2.2.3.1 Sistema de Braak Braak**

A avaliação da patologia neurofibrilar relacionada à doença de Alzheimer (DA) requer um procedimento que permita uma diferenciação suficiente entre os estágios inicial, intermediário e tardio. O estadiamento da patologia neurofibrilar relacionada à DA descrita originalmente em 1991 pelo Sistema de Braak Braak. Esse classifica em seis estágios as lesões geradas pela DA em função da área

cerebral ocupada pelos emaranhados, tendo como foco a área cortical, relacionada à memória (BRAAK, H., BRAAK, E., 1991)

No estágio 1, as lesões se desenvolvem na região transtentorial e núcleos subcorticais ocasionalmente mostram as primeiras alterações na ausência de envolvimento cortical; enquanto no estágio 2 as lesões se estendem para a região entorrinal (particularmente sua camada celular superficial). No estágio 3 as lesões se estendem para o neocórtex dos giros fusiforme e lingual e tornam-se mais graves. No quarto estágio o processo da doença progride mais amplamente em áreas de associação neocortical e a densidade das lesões geradas no terceiro são estendidas e aumentadas. No quinto estágio a patologia neocortical se estende em forma de leque nas direções frontal, superolateral e occipital, e atinge a região peristriada enquanto no sexto as áreas neocorticais secundárias e primárias são atingidas e, no lobo occipital, se estende até a área estriada (BRAAK, H. *et al*, 2006).

### **2.3 RNAs não codificadores de proteínas (*Non-coding RNAs* - ncRNAs)**

Os ncRNAs são uma classe importante de biomoléculas que possuem importância na expressão gênica, particularmente por meio da sua regulação por meio de mecanismos epigenéticos (QUINN, J.J., CHANG, H.Y., 2016). Estudos recentes demonstram que existe uma maior quantidade de sequências não codificadoras quando comparadas às codificadoras (STATELLO, L. *et al.*, 2021).

Existem duas classes principais de ncRNAs: os pequenos RNAs, que apresentam em sua sequência um total de bases nucleotídicas menor que 200, sendo identificados: tRNA (RNA transportador), rRNA (RNA ribossômico), miRNA (microRNA), snoRNA (*small nucleolar RNA* – pequeno RNA nuclear); e os lncRNAs (*long non-coding RNA*), classificados como RNAs não codificadores com uma sequência nucleotídica acima de 200 bases (WATSON, C., BELLI, A., PIETRO, V., 2019).

#### **2.3.1 RNAs longos não codificadores de proteínas (*Long non-coding RNAs* - lncRNAs)**

Os lncRNAs podem ser caracterizados dependendo da sua posição no genoma como intrônicos, ou intergênicos; ou com relação ao sentido de atuação,

sendo antisense ou bidirecional, existindo ainda os lncRNAs que atuam como *enhancers* (eRNAs) (PONTING, C., OLIVER, P., REIK, W., 2009).

Os lncRNAs também podem ser classificados segundo os seus mecanismos moleculares (arquétipos), sendo eles: *decoys*, geralmente atuam bloqueando a ação de outras moléculas como microRNAs, fatores de transcrição e *RNA-binding proteins* por se ligarem à fatores reguladores dos mesmos; *guides*, pode auxiliar na ativação ou repressão da transcrição de genes por relocizarem complexo ribonucleoproteico a cromatina; *scaffolds*, podem formar um arcabouço para diferentes proteínas semelhante ao dos lncRNAs guias (*guide*), contudo, afetam os componentes moleculares de seu próprio complexo (HERMANS-BEIJNSBERGER *et al*, 2018).

Entretanto, existe uma diversidade de mecanismos e integração, sendo de importante ressalva que a atribuição de um único arquétipo não é suficiente para determinar a capacidade funcional de um lncRNA. Muitos destes possuem combinações de arquétipos e podem desempenhar diversas funções biológicas, operando de modo duplamente funcional (KOPP, F., MENDELL, J.T., 2018).

### 2.3.1.1 lncRNAs na Doença de Alzheimer

A maioria dos lncRNAs são especificamente expressos no cérebro. Nesse sentido, surge o interesse em se realizar pesquisas que relacionam essas moléculas com os mecanismos que levam ao desenvolvimento da DA (BRIGGS, J.A. *et al*, 2015). Pesquisas de análise transcriptômica em cérebros humanos *post-mortem* identificaram alguns lncRNAs expressos, de maneira diferencial em pacientes portadores da Doença de Alzheimer (ZHOU, X., 2015; ANNESE, A. *et al.*, 2018; CAOM, L. *et al.*, 2018).

Dentre as funções exercidas pelos lncRNAs na DA, se encontram: a regulação da transcrição de mRNA, lncRNA *NDM29* que está diretamente ligado à produção exacerbada de placas beta amilóides, pela elevada transcrição do gene *APP*; a manutenção da estabilidade do mRNA, o *BACE-1AS*, em junção com o *BACE-1* geram um aumento dos níveis de mRNA, sendo essenciais para a manutenção da estabilidade do mRNA, tendo em vista que seus transcritos se emparelham formando um duplex (FAGHIHIM, *et al.*, 2008; DINGFENG, LI *et al.*, 2020).

Também é de conhecimento científico a interferência dos lncRNAs no *splicing* do pré-mRNA e, um deles que se associa com a DA é o 51A; este possui uma ação no *intron* 1 do pré-mRNA da proteína SORL1 (afeta o tráfico da apolipoproteína), gerando um *splicing* alternativo (DINGFENG, LI *et al.*, 2020).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Caracterizar e investigar a presença lncRNAs diferencialmente expressos (DE-lncRNAs) no transcriptoma de pacientes portadores da Doença de Alzheimer, fazendo o uso de bancos de dados públicos de RNA-seq derivados de amostras sanguíneas e *post-mortem* do tecido nervoso humano;

#### 3.2 Objetivos específicos

- Identificar e tabelar novos DE-lncRNAs presentes em dados públicos;
- Determinar a presença de DE-lncRNAs comuns no tecido hematopoiético e nervoso;
- Caracterizar os DE-lncRNAs quanto a posição de *loci* genômicos já relacionados a etiologia da Doença de Alzheimer em humanos;
- Identificar possíveis padrões de expressão de mRNAs-lncRNAs que possam estar associados a vias de sinalização na DA.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Obtenção e manipulação dos dados de RNA-seq

Foram utilizados três conjuntos de dados públicos independentes: GSE110732, GSE106443/GSE161199, e GSE53699, totalizando 80 amostras do tecido nervoso e 17 amostras sanguíneas.

Foram obtidos os dados de RNA-seq da plataforma SRA (*Sequence Read Archive*) vinculada ao NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Os arquivos de SRA referentes aos experimentos de RNA-seq de amostras de tecido humano (*cérebro, post mortem*) foram convertidos em formato FASTQ utilizando SRA Toolkit (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/docs/toolkitsoft/>). Em seguida, os arquivos FASTQ passaram pelo processamento de remoção de adaptadores e *reads* de baixa qualidade utilizando o software Trim Galore v.0.6.5 ([https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim\\_galore/](https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/)).

Após o processamento com Trim Galore, foi realizada a avaliação dos arquivos FASTQ quanto a sua qualidade por intermédio do software FastQC v.0.11.7 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>).

Realizou-se o alinhamento dos *reads* utilizando o software HISAT2 (Kim et al. 2015) contra o genoma humano de referência GRCh37/hg19. Posteriormente, os arquivos SAM (*Sequence Alignment Map*) gerados pelo alinhamento dos *reads* contra o GRCh37/hg19 foram convertidos em formato BAM (*Binary Alignment Map*) por meio do software SAMTools (LI, et al, 2009).

### 4.2 Identificação de lncRNAs (lncRNAs) diferencialmente expressos na doença de Alzheimer

Os dados de alinhamento (em formato BAM) foram analisados utilizando o software SeqMonk v. 1.48.0 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/seqmonk/>) por meio do pipeline de análise de RNA-seq internalizado no programa utilizando a ferramenta DESeq2 ( $p < 0,05$ ) (LOVE, et al. 2014). As coordenadas genômicas de genes e dos transcritos de lncRNAs obtidas do banco de dados LNCipedia 5.2 (<https://lncipedia.org/>) e da anotação interna de mRNAs (genoma de referência GRCh37/hg19) do software SeqMonk v. 1.48.0. Os DE-lncRNAs e DE-mRNAs foram comparados a dados de *loci* associados a doença de Alzheimer descritos no NIAGADS Genomics database



(<https://www.niagads.org/genomics/>) e AlzGene (<http://www.alzgene.org/>). A investigação quanto a possíveis funções já descritas para cada DE-lncRNAs foi realizada com base em achados da literatura ([www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)) e no banco de dados GeneCards (<https://www.genecards.org/>).

#### **4.3 Identificação de redes de co-expressão gênica mRNA-lncRNA e identificação de possíveis vias biológicas associadas.**

Foram identificados lncRNAs e mRNAs com padrão diferencial de expressão, e selecionados mRNA-lncRNAs vizinhos com proximidade de 300 Kb a montante e a jusante de cada DE-mRNA identificado, utilizando a ferramenta *probe report* do software SeqMonk v. 1.48.0. Utilizando a ferramenta webCEMiTool (CARDOZO et al. 2019; <https://cemitool.sysbio.tools>), seguindo parâmetros padrão da mesma, foram analisados os dados de expressão pré selecionados dos conjuntos mRNA-lncRNA vizinhos. Essa análise permitiu a identificação de módulos de co-expressão e identificação de vias de sinalização ou metabólicas (*pathways* biológicos) associadas a cada um desses módulos (ORA - *over representation analysis*) utilizando um *pipeline* modificado de LIMA e colaboradores (2019).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Análise da Expressão Diferencial dos lncRNAs em pacientes portadores da Doença de Alzheimer

Com o intuito de investigar e explorar as contribuições genéticas epigenéticas na doença de Alzheimer tanto no nível de classificação de lncRNAs quanto a funcionalidade e mecanismos de ação, assim como as possíveis vias biológicas em que eles atuam, foram analisados quatro conjuntos de dados de estudo RNA-seq humanos.

Nestes continham dados de RNA-seq referentes ao tecido nervoso (córtex pré-frontal, lobo temporal e hipocampo) e tecido hematopoiético (sangue periférico). A idade média de idade dos pacientes foi de 72,4 anos no momento de coleta de material biológico, assim como a presença de amostras do sexo masculino foram mais numerosas, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1: Descrição amostral dos dados utilizados no presente estudo para a realização das análises de RNA-seq.

<b>GSE</b>	<b>GSE110732</b>	<b>GSM4656372</b>	<b>GSM5600938</b>	<b>GSM5600938</b>
<b>DA</b>	<b>Córtex Pré Frontal</b>	<b>Lobo temporal Lateral</b>	<b>Hipocampo</b>	<b>Tecido Hematopoiético</b>
Idade média (anos)	83.0	62.6	72.0	72.0
<b>Sexo</b>				
Feminino (n)	47	2	2	2
Masculino (n)	54	28	4	4

Foram encontrados DEs (*differentially expressed*) mRNAs e lncRNAs em dados de RNA-seq referente às amostras do Córtex Pré-Frontal e encontramos um total de 1871 lncRNAs (*long non-coding*). Foram selecionados DE-lncRNAs com  $\log_2$  fold change  $\geq 2$ , resultando em um conjunto de 56 transcritos (Figuras 2 e 3).

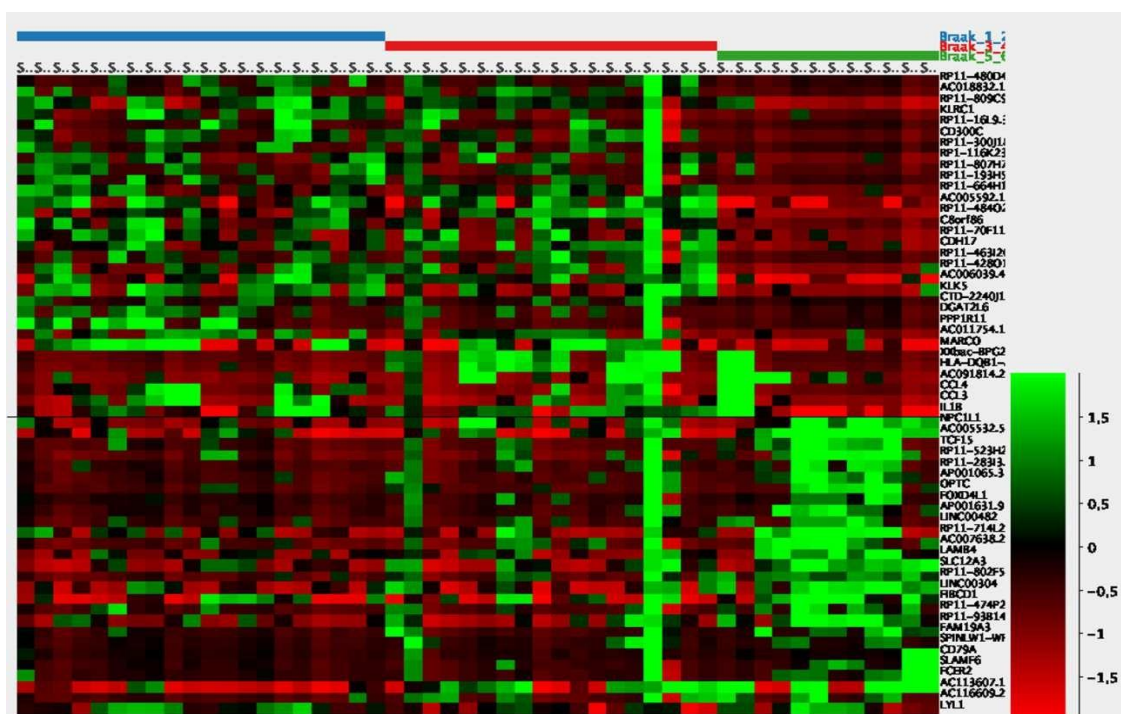


Figura 2: Heatmap da anotação genômica de mRNAs (SeqMonk v 1.48.0) diferencialmente expressos ( $\log_2$  fold change > 2 /  $p < 0,05$ ) em amostras de PFC analisadas (estágio : braak 1-2 - barra azul; braak 3-4 - barra vermelha; braak 5-6 - barra verde). Dados representados em  $\log_2$  RPKM.

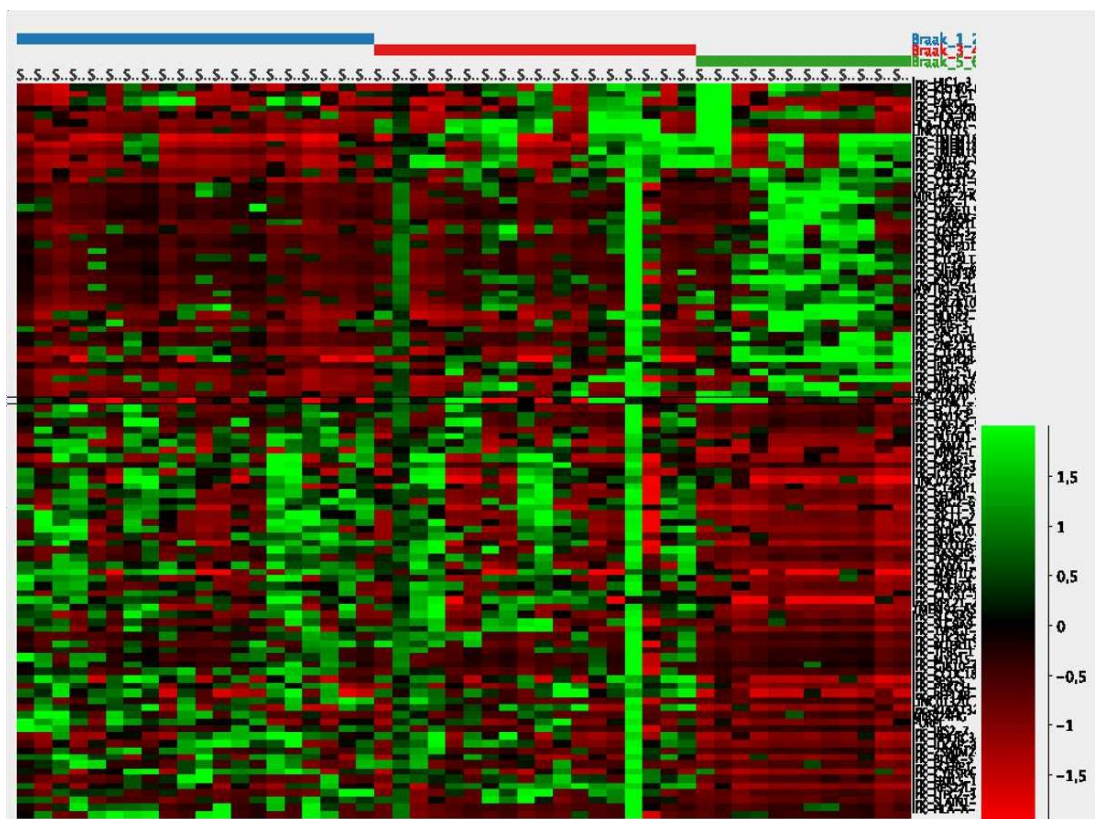


Figura 3: Heatmap representando genes codificadores lncRNAs (LNCipedia) diferencialmente expressos ( $\log_2$  fold change > 2 /  $p < 0,05$ ) em amostras de PFC analisadas (estágio : braak 1-2 - barra azul; braak 3-4 - barra vermelha; braak 5-6 - barra verde). Dados representados em  $\log_2$  RPKM..

Da mesma maneira, encontrou-se DEs (*differentially expressed*) mRNAs e lncRNAs em dados de RNA-seq referente às amostras do Lobo Temporal Lateral, totalizando 1055 lncRNAs (*long non-coding*). Foram selecionados DE-lncRNAs com  $\log_2$  *fold change*  $\geq 2$ , resultando em um conjunto de 151 transcritos (Figuras 4 e 5).

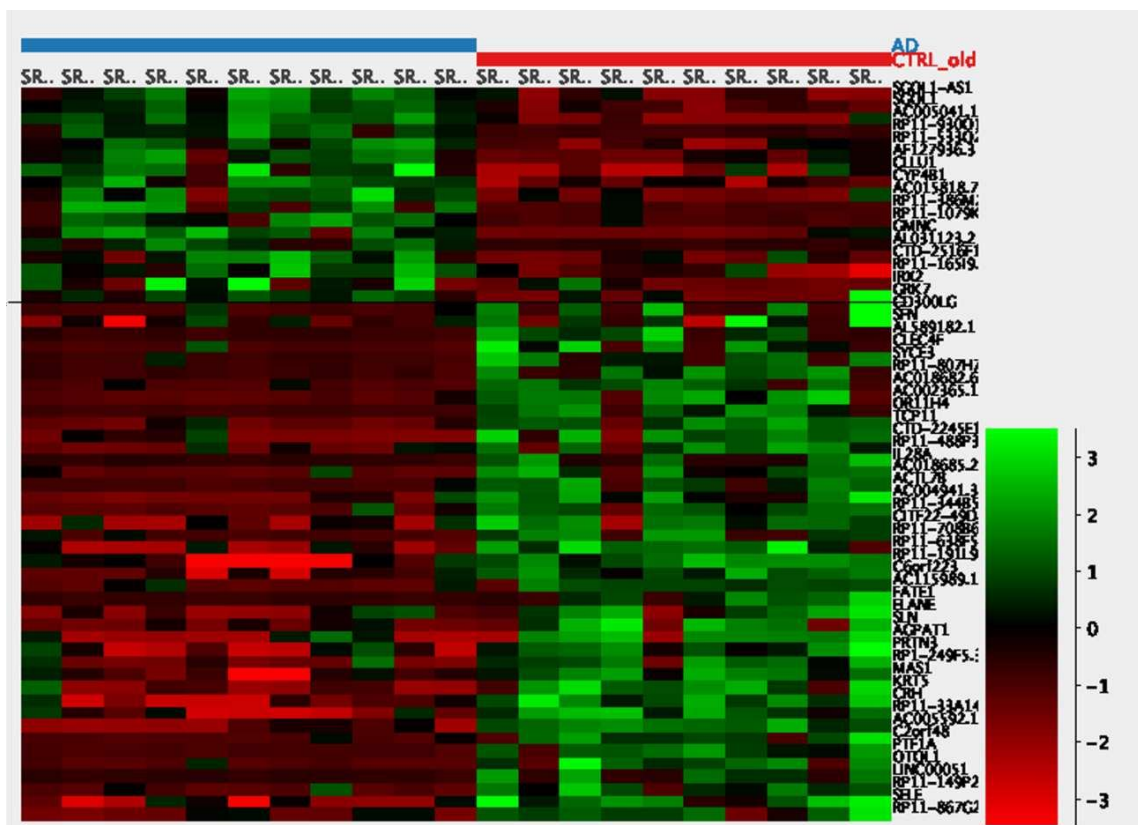


Figura 4: Heatmap da anotação genômica de mRNAs (SeqMonk v 1.48.0) diferencialmente expressos ( $\log_2$  *fold change*  $> 2$  /  $p < 0,05$ ) em amostras de LTL analisadas (controle : indivíduos saudáveis /braak 1-2 - barra vermelha; AD braak 5-6 - barra azul). Dados representados em  $\log_2$  RPKM.

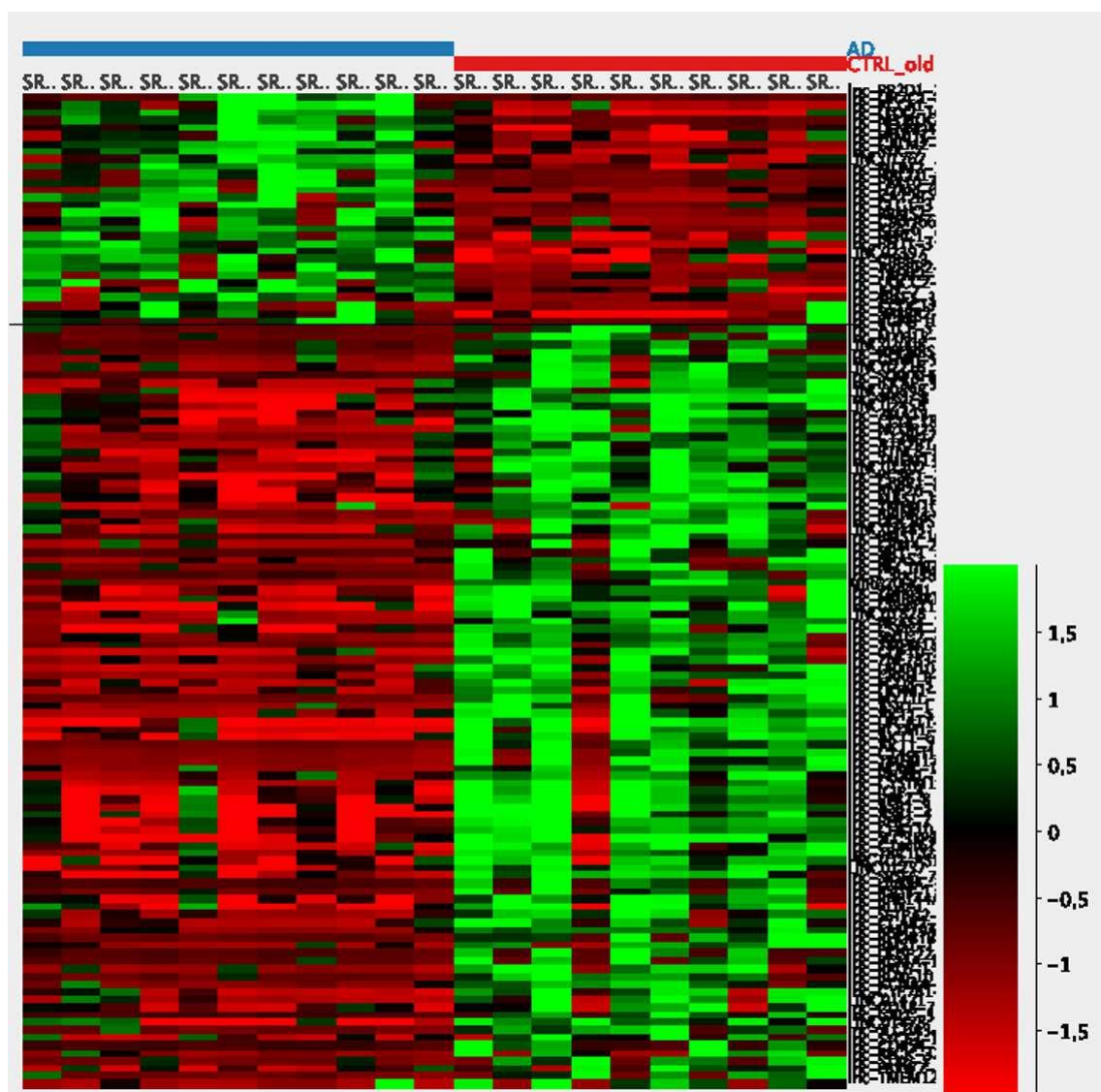


Figura 5: Heatmap representando genes codificadores lncRNAs (LNCipedia) diferencialmente expressos ( $\log_2 \text{fold change} > 2$  /  $p < 0,05$ ) em amostras de LTL analisadas (controle: indivíduos saudáveis /braak 1-2 - barra vermelha; AD braak 5-6 - barra azul). Dados representados em  $\log_2$  RPKM.

Ao analisar os *heatmaps* percebe-se padrões de expressão heterogêneos entre as amostras utilizadas como controle e doença, tanto no PFC quanto no LTL. Além disso, é possível notar uma inversão no padrão de expressão entre as amostras: genes que se encontravam hipoexpressos no controle, se apresentam hiperexpressos nos indivíduos portadores da desordem, assim como o contrário.

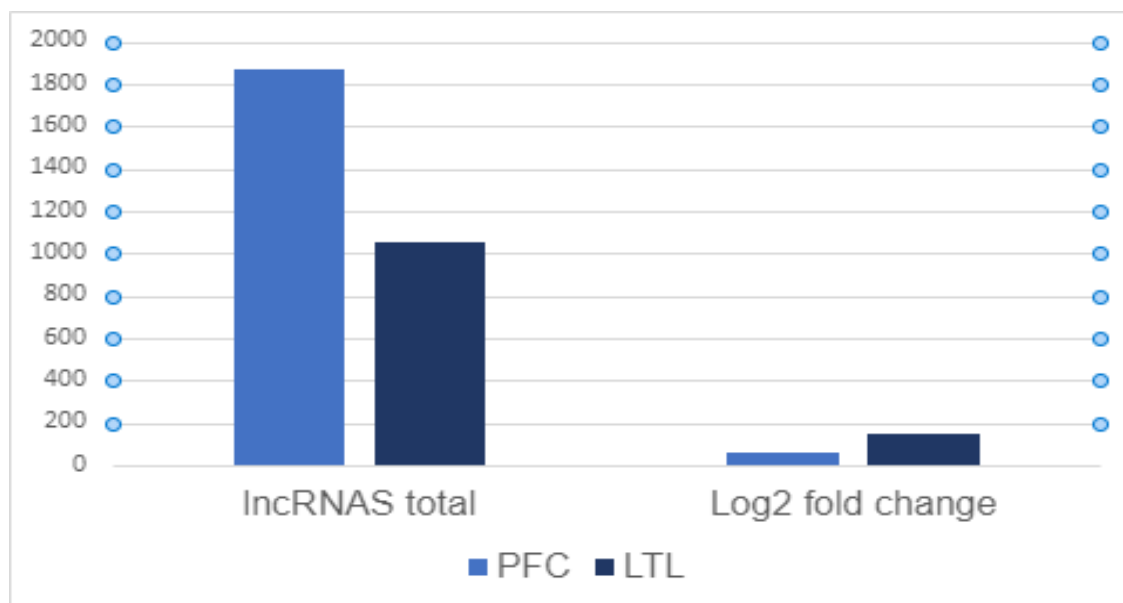


Figura 6: lncRNAs diferencialmente expressos no Córtex Pré Frontal (PFC) e Lobo Temporal Lateral (LTL) em pacientes portadores da Doença de Alzheimer. No PFC foram identificados 1871 lncRNAs e no LTL 1055 lncRNAs;  $\log_2$  fold change 56 lncRNAs selecionados no PFC e 151 lncRNAs selecionados no LTL.

No que se refere à classificação estrutural dos lncRNAs classificados segundo dados do banco LNCipedia, em ambas as amostras, de PFC quando LTL, a maioria dos lncRNAs foram classificados como *intronic* ou transcritos *antisense* (figura 6A e 6B).

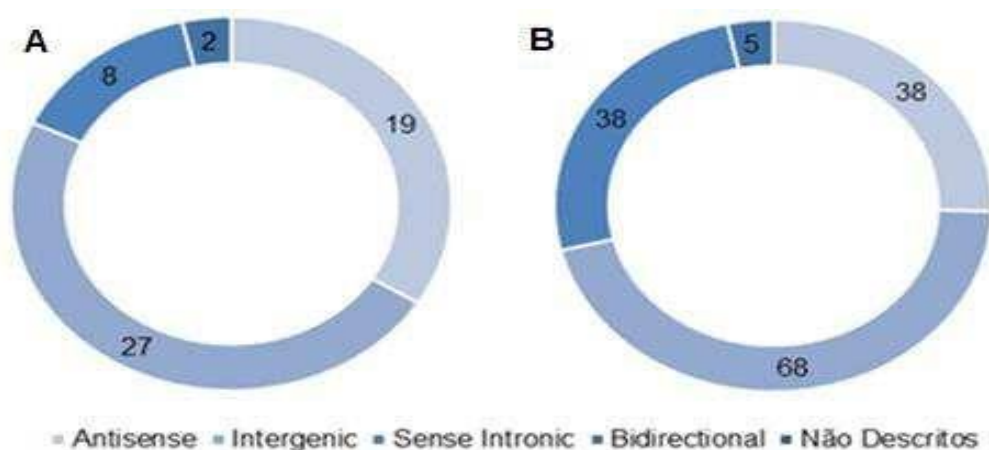


Figura 7: Descrição estrutural dos lncRNAs diferencialmente expressos ( $\log_2$  fold change  $\geq 2$ ) nas amostras de RNA-seq de Córtex Pré-Frontal (A) (PFC) e Lobo Temporal Lateral (LTL) (B) segundo banco de dados LNCipedia.

Em (A) é possível visualizar que 19 lncRNAs foram classificados como *antisense*, 2 como *bidirectional*, 27 como *lincRNA*, 9 como *sense intronic*; enquanto

em (B) 38 lncRNAs foram classificados, sendo 5 *bidirectional*, 68 como *lincRNA*, 38 como *sense intronic* e 2 não foram descritos.

A abordagem utilizada para a descrição funcional dos 207 lncRNAs caracterizados em amostras de pacientes portadores da DA demonstrou que apenas 19 destes possuem função descrita na literatura como descritos na plataforma GeneCards, enquanto 188 são transcritos que não possuem função conhecida, como demonstra Figura 7. Esses novos transcritos encontrados em sua maioria apresentam diferenças estatisticamente significativas de expressão tecido-específica, onde 42 são diferencialmente expressos somente no córtex pré-frontal, 144 no lobo temporal lateral e apenas o *lnc-MRPL57-9* apresentou expressão diferencial em ambos os tecidos.

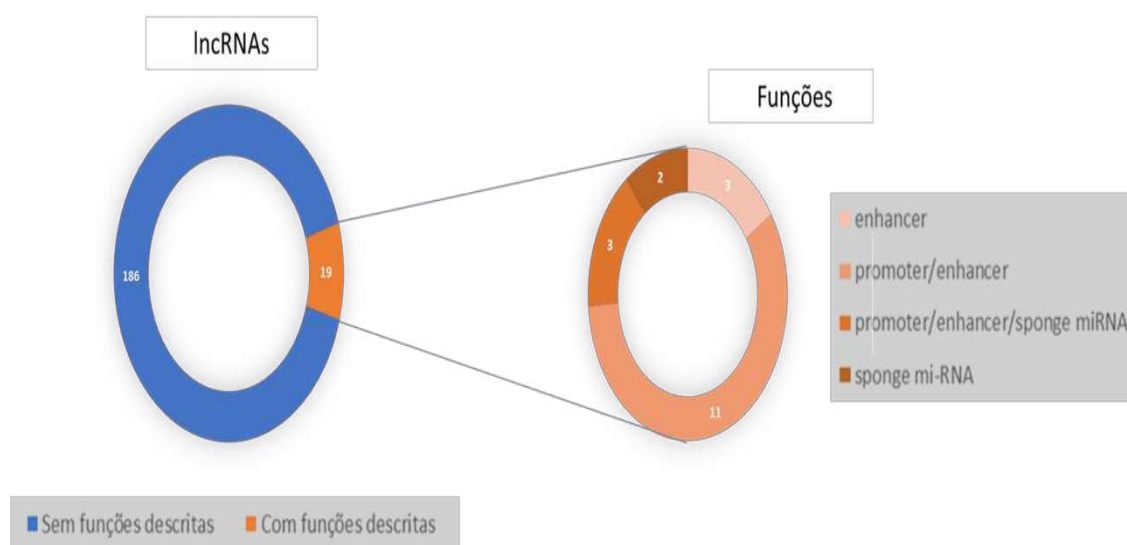


Figura 8: Descrição funcional dos lncRNAs com caracterização em Alzheimer em banco de dados. De 186 lncRNAs caracterizados em banco de dados de DA, 19 possuíam classificação segundo a literatura. Quanto à caracterização funcional, 2 exerciam a função de esponja de miRNA, 3 de enhancer, 3 de promotor/*enhancer* e esponja para miRNA, 11 de promotor/*enhancer*.

O *lnc-MRPL57-9* é um lncRNA localizado no cromossomo 13 que possui apenas um *exon* de 942 pb sendo classificado como intergênico no LNCipedia, mas quando observado quanto a posição no *UCSC genome browser* ele encontra-se dentro de um intron do gene *MIPEPP3* (*mitochondrial intermediate peptidase pseudogene 3*). Utilizando o *UCSC track "Phenotype and Literature (publications)"*, não foi encontrado nenhuma publicação relativa a região onde está ancorado o *lnc-MRPL57-9*, relativa a doença de Alzheimer. Até o presente momento não há informação sobre esse lncRNA e ainda não existem estudos associando o mesmo

com a Doença de Alzheimer. Apesar de ser necessário uma maior abordagem e pesquisa sobre esse lncRNA o fato dele ser o único expresso em ambos os tecidos estudados reforça a necessidade de estudos futuros que caracterizem a função do mesmo na DA.

Foram utilizadas duas plataformas para tentar identificar as funções dos lncRNAs, o banco de dados GeneCards (<https://www.genecards.org/>) e o NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)). Ao pesquisar frente à literatura, dentre os 19 lncRNAs caracterizados funcionalmente, apenas 3 possuem vias em que é possível inferir associações com os mecanismos fisiopatológicos da DA, o que demonstra um novo horizonte de pesquisas de associação dos lncRNAs e a DA, ainda a ser explorado.

O lncRNA *H19*, um gene maternalmente expresso regulado por *imprinting* genômico, foi um dos primeiros lncRNAs a serem descritos, possuindo correlações atuais com os diferentes tipos de câncer (JARROUX, J., MORILLON, A., PINKSKAYA, M, 2017). Entretanto, estudos recentes demonstram que existe uma relação entre funções fisiológicas no envolvimento de distúrbios do Sistema Nervoso Central (SNC) (ZHANG, L. *et al*, 2021).

Em um estudo realizado por Zhang *et al.* (2021) foi descoberto que o *H19* funciona como ce-RNA (RNA endógeno competitivo ou esponja de miRNAs) que sequestra *miR-129*. Esses autores concluíram que o lncRNA *H19* silenciado com a consequente regulação positiva do *miR-129* inibem a apoptose das células PC12 induzidas por A $\beta$ 25-35 (amilóide-beta proteína - fragmento 25/35) em um modelo celular de DA. Dessa maneira, apurou-se que o *knockdown* do lncRNA *H19* promove a viabilidade, suprime a apoptose e inibe o estresse oxidativo em células PC12 induzidas por A $\beta$ 25-35 regulando a expressão de miR-129. Portanto, o lncRNA *H19* pode ser um alvo terapêutico para DA. Contudo, apesar do estudo fornecer evidências da função deste lncRNA na fisiopatologia da DA, a mesma ainda não é extremamente esclarecida. (ZHANG *et al*, 2021).

Conforme relatado em dois estudos, o lncRNA *PURPL* está diretamente associado com a modulação da fosforilação da proteína ULK1 (Quinase de Ativação da Autofagia 1), regulando negativamente a expressão e atividade da proteína P53 ligada à diferenciação celular e ponto de controle genético para a parada do ciclo celular em resposta a danos no DNA, associando esse lncRNA ao câncer (HAN, S., LI, X., WANG, K., *et al.*, 2021; FU, XUEYAN, *et al.*, 2019).



Apesar de se relacionar diretamente ao câncer devido à interrupção do ciclo celular, essa proteína tem sido associada ao desenvolvimento de algumas neuropatias, como por exemplo a DA. Um estudo realizado por FARMER, *et al.*, (2020), demonstrou como a P53 interage com a proteína TAU, formando oligômeros e fibrilas na DA, assim como pode prejudicar as vias de reparo de danos ao DNA reguladas pela P53 nessa patologia, levantando a hipótese de que a interrupção do fator de transcrição da P53 pode definir um curso irreversível para a neurodegeneração na DA e potencialmente outras tauopatias, merecendo uma investigação mais aprofundada.

Assim como o lncRNA citado anteriormente, o lncRNA *IRAIN* também tem sido correlacionado à diversos tipos de cânceres por meio da supressão dos fatores de crescimento das células, logo que quando silenciado por intermédio da metilação, impede a expressão do *VEGF-A* via ação de um *enhancer* (LI, YANG, *et al.*, 2020).

Além desse, o lncRNA *NCK1-AS1* também possui associação com cânceres, como os de ovário e melanoma, exercendo função de esponja para miRNAs e acentuando níveis de expressão alvejados por esses miRNAs, principalmente em vias de proliferação, o que é demonstrado em diversos estudos realizados desde 2018 (CHANG *et al.*, 2020).

Um estudo realizado por GU *et al.*, (2017) em pacientes com DPOC (Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica) explorou os mecanismos de senescência de AECII (células alveolares epiteliais do tipo II) regulados pelas vias de sinalização sirtuína 1 (SIRT1) e *forkhead box O 3a* (FOXO3A) - fator de transcrição, também mediados pela ação do lncRNA-*SALRNA1*. Nessas células analisadas, os níveis de expressão de lncRNA associado a senescência (*SALRNA1*), assim como o da proteína SIRT1 e do fator de transcrição *FOXO3A* foram reduzidos, mas os do lncRNA *SALRNA2* e *SALRNA3*, tal como da proteína P53 e P21 foram regulados positivamente nos tecidos pulmonares de pacientes com DPOC em comparação com o controle. Os resultados dessa pesquisa indicaram que as vias de sinalização SIRT1/p53 e FoxO3a mediadas por lncRNA podem regular a senescência de AECII na patogênese da DPOC, o que pode fornecer uma nova base experimental para o tratamento da DPOC (GU, C. *et al.*, 2017).

Um estudo sobre o *LINC002470* publicado em 2020 na revista *Cell* associa o mesmo à agressividade das células cancerígenas na bexiga, assim como

induzem positivamente a sinalização de  $\beta$ -catenina, sinalização *Notch* e sinalização *Smad2/3*. Os pesquisadores chegaram à conclusão de servir como potenciais biomarcadores líquidos para a vigilância prognóstica da progressão do câncer de bexiga (HUANG *et al.*, 2020).

O lncRNA *PCAT19* apresenta uma grande relevância na tumorigênese tendo seu papel descrito em câncer de próstata, glioma e câncer de laringe (HUA *et al.*, 2018; XIE; HU, 2020; XU; GUO; ZHANG, 2019). Um estudo realizado por Xu, Guo e Zhang (2019) demonstrou que *PACAT19* é capaz de promover a proliferação celular e tumorigênese por meio da modulação do eixo *miR-182/PDK4*. Além disso, foi demonstrado que o eixo *PACAT19/miR-182/PDK4* regula a proliferação celular modulando a glicólise e a respiração mitocondrial (XU; GUO; ZHANG, 2019). Os genes de *miR-182* e *PDK4* desempenham alguns papéis constatados em doenças neurodegenerativas como esclerose múltipla (GHAREGHANI *et al.*, 2019; GROEN *et al.*, 2020; NAJAFI; PEYMANI, 2020), neuroinflamação perinatal (GAO *et al.*, 2018) e Alzheimer (WEI, 2020). Essa correlação entre *PACAT19* e os genes *miR-182* e *PDK4* pode implicar na existência da participação de *PACAT19* nas vias patogênicas de doenças neurodegenerativas como Alzheimer.

Assim como os lncRNAs supracitados, o *SNHG7*, *GAS5*, *PVT1*, e *PART1* fazem parte de diversas vias de sinalização, desde autofagia, e diferenciação celular. Em todas as pesquisas encontradas o mesmo apresentava função de “esponja” para miRNA em casos de adenoma pituitário, carcinoma ou câncer colorretal, intensificando e aumentando a gravidade dos mesmos (CAO, Y. *et al.*, 2021; LOU, T. *et al.*, 2020; NI *et al.*, 2019; BIAN, *et al.*, 2020).

Ensaio de proliferação celular indicaram que o lncRNA *HLA-DQB1-AS1* é um potencial oncogene em HCC (Carcinoma Hepatocelular). Além disso, ensaios de captura de conformação cromossômica alelo-específica revelaram que um *enhancer* sobreposto com o SNP rs2647046 interagiu com o promotor de *HLA-DQB1-AS1* para influenciar especificamente sua expressão via ação de CTCF na formação de alças de longo alcance na cromatina.

A potencialização dessa interação *enhancer/promotor* por formação de alças na cromatina conferiu a suscetibilidade ao HCC, sugerindo um importante mecanismo de modulação da expressão de lncRNA para SNPs regulatórios associados ao risco na etiologia do HCC (WANG, *et al.*, 2021).

Dois dos lncRNAs diferencialmente expressos encontrados nas amostras de LTL, o *LINC00484* e o *LINC01767* foram relacionados à ferroptose e progressão tumoral em um estudo realizado por HE *et al.* (2021) estudo identificou uma nova assinatura de lncRNA relacionada a esta patologia que poderia efetivamente estratificar o prognóstico de pacientes com glioma com desempenho preditivo adequado (HE, Y. *et al.*, 2021).

O lncRNA *LINC01134* tem sido estudado por promover metástases HCC pela via de ativação de sinalização AKT1S1 e NF-κB. Estudos têm sugerido *LINC01134* como um potencial biomarcador prognóstico e alvo terapêutico para HCC (WANG *et al.*, 2020). Um outro estudo caracterizou-o funcionalmente como esponja para o miRNA-478 ou *ce-RNA*, tendo em vista que regula positivamente a proteína 1 de reconhecimento de estrutura específica (SSR1). A associação de ambos deve ser desenvolvida como alvo terapêutico promissor para o HCC (ZHENG, *et al.*, 2020.). Da mesma forma, o lncRNA *LINC001546* é induzido diretamente pela sinalização *AKT/STAT3*, funcionando como uma potente molécula pró-metastática, se mostrando essencial para a invasão tumoral induzida por AKT ativa, metástase e resistência em adenocarcinoma de pulmão (LAD), podendo ser futuro alvo de pesquisas terapêuticas (TIAN *et al.*, 2020).

Apesar de os 4 lncRNAs descritos acima (*LINC001546*, *LINC01134*, *LINC00484* e *LINC01767*), não foram encontrados na literatura atual relação dos mesmo com alguma via de desenvolvimento da DA ou de outras doenças neurodegenerativas.

O lncRNA *LINC00473* é expresso em várias regiões do cérebro e está associado a modulação da expressão de 35 genes codificadores de proteínas, atuando como uma esponja de miRNAs; muitos dos quais já possuem correlação com a depressão, como *DUSP6* (LABONTÉ *et al.*, 2017). Um estudo identificou o gene enriquecido neuronal específico de primata *LINC00473* como regulado negativamente no córtex pré-frontal (PFC) de mulheres deprimidas, mas não de homens (ISSLER, *et al.*, 2020). Existem evidências convincentes que apoiam tanto a noção de que a depressão precoce pode atuar como um fator de risco para a demência na vida adulta, quanto a depressão tardia pode ser vista como um pródromo para a demência. Há também evidências que apoiam ambas as condições mostrando alterações neurobiológicas semelhantes, particularmente na

substância branca do cérebro, indicando fatores de risco compartilhados ou um padrão compartilhado de dano neuronal (BENNETT, S., THOMAS, A.J., 2014).

A depressão é um distúrbio comum que, assim como o Alzheimer, afeta as mulheres mais que os homens (FERRARI *et al.*, 2013; SEEDAT *et al.*, 2009; SOUZA *et al.*, 2019). *LINC00473* foi encontrado hipoexpresso em nosso estudo, ainda que não tenhamos realizado a análise diferencial entre sexos. Estudos futuros são necessários para avaliar se esse lncRNA poderia participar do desenvolvimento de sintomas de depressão em pacientes com DA.

## 5.2 Genes diferencialmente expressos em sangue e hipocampo

Nas amostras referentes tecido hematopoiético e hipocampo não houve achados de expressão diferencial de lncRNAs, apenas com relação aos RNAs codificadores de proteínas (*coding RNAs*): 6 DEGs nas amostras de hipocampo (*APBB2*, *PMEPA1*, *TAB3-AS2*, *GPATCH4*, *PKHD1L1* e *LIMS1*); e apenas 4 amostras sangue periférico (*NDST4*, *CNTN6*, *GRIK1* e *FAM46C*), como detalha a Tabela 2.

Tabela 2: Genes diferencialmente expressos no hipocampo e no sangue periférico e suas respectivas funções segundo a literatura.

Hipocampo	Sangue periférico
<i>APBB2</i> : a superexpressão proporciona a formação de placas beta-amiloides.	<i>NDST4</i> : não possui associação com a DA até o presente momento; contudo, achados na literatura o associam com a ELA e neurodegeneração;
<i>PMEPA1</i> : associado às respostas neuroinflamatórias;	<i>CNTN6</i> : associado à memória, cognição e desenvolvimento neurológico;
<i>PKHD1L1</i> : relacionado à longevidade;	<i>GRIK1</i> : associado ao desenvolvimento neurológico;
<i>GPATCH4</i> : associado à regulação do crescimento celular e estrutura nucleolar;	<i>FAM46C</i> : não possui achados na literatura.
<i>LIMS1</i> e <i>TAB2-AS2</i> : não possuem achados na literatura até o presente momento.	

O gene *APBB2* foi encontrado diferencialmente (hipoexpresso em amostras de DA) expresso em sangue periférico, codifica o membro 2 da família B de ligação à proteína precursora de  $\beta$ -amilóide (*APBB2* ou *FE65-like*, *FE65L1*), uma proteína adaptadora que se liga ao domínio citoplasmático da proteína precursora de  $\beta$ -amilóide ( *$\beta$ APP*). A superexpressão de *APBB2* proporciona a formação de  $\beta$ -amilóide ( $A\beta$ ), o principal constituinte das placas senis presentes na DA. Estudos têm sugerido que polimorfismos no gene *APBB2* podem ser propostos como fatores de risco candidatos para a DA (GOLANSKA, E. *et al.*, 2008; LI, Y. *et al.*, 2005).

Polimorfismos do gene *PKHD1L1* já foram relacionados à longevidade. ERDAMN *et al.*, (2016) analisando as frequências alélicas e genóticas dos sítios polimórficos Alu(I/D) nos genes *PLAT*, *PKHD1L1*, *STK38L*, e *TEAD1* identificou o genótipo *PKHD1L1\*I/D* como um fator significativo no fornecimento de longevidade masculina. Tendo em vista que quanto maior o tempo de vida, maiores são as chances de se desenvolver DA, pesquisas envolvendo esse gene podem auxiliar no levantamento epidemiológico da mesma, assim como sustentar esses achados (ERDAMN *et al.*, 2016).

O gene *PMEPA1* codifica uma proteína transmembrana que contém um motivo de interação *Smad* (*SIM*). As interações com as proteínas Smad suprimem o receptor de andrógenos e as vias de sinalização do fator de crescimento transformador beta (TGF-beta), diretamente ligado à proliferação celular e estudos relacionados ao câncer de próstata, pancreático e melanoma (SHARAD *et al.*, 2020; KAKIMANI *et al.*, 2021; QIU *et al.*, 2021). Apesar dos estudos realizados sobre o mesmo não apresentarem correlação direta com a DA como o gene supracitado, um estudo realizado por ROMMY, *et al.* (2015) concluiu que em indivíduos idosos, embora o fator de crescimento transformador  $\beta$  (TGF $\beta$ ) seja regulado positivamente, sua sinalização *Smad3* canônica é bastante reduzida. Esse comprometimento *Smad3* relacionado à idade reduz a ativação protetora enquanto faz com que a neuroinflamação persista por facilitar a ativação citotóxica da microglia através de vários mecanismos celulares, potencializando a neurodegeneração mediada pela microglia (ROMMY, *et al.*, 2015).

Com relação ao gene *GPATCH4*, foram encontrados 4 artigos publicados desde 2018 (BLOTTA *et al.*, 2009; SIGAL *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2021). O mesmo possui associação com o desenvolvimento de tumores neuroendócrinos e adenocarcinoma. Contudo, a publicação mais recente sobre o mesmo (2021)

identificou que a proteína por ele codificada (proteína 4 contendo domínio G *patch*) possui uma nova função juntamente com os corpos de Cajal, estando envolvida na regulação de crescimento celular e estrutura nucleolar (HIRAWAKE-MOGI; THANH NHAN; OKUWAKI, 2021).

Uma pesquisa realizada em 2021 referente ao gene *NDST4* apontou-o como um pontencial alvo para miRNA em pacientes portadores de Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA), identificando vias biológicas como neurodegeneração incluindo orientação axônica e potencialização de longo prazo (LO *et al.*, 2021). Esse ofereceu informações sobre possíveis fatores patogênicos e oportunidades de diagnóstico da ELA. Um outro estudo apresenta níveis reduzidos de *NDST4* em tecidos medulares de ELA *post-mortem* (FIGUEROA-ROMERO *et al.*, 2012). Apesar de se tratar de um gene associado à etiologia de uma doença neurodegenerativa, não foram encontradas associações diretas com a DA até o momento.

Ao passo que, o gene *CNTN6* tem sido estudado por ser um possível candidato ao desenvolvimento neurológico e de desordens psiquiátricas como o autismo, esquizofrenia, depressão, transtorno bipolar, entre outras (HU *et al.*, 2015). Assim como variações do número de cópias dos genes da família contactina (CNTNs), incluindo *CNTN3*, *CNTN4*, *CNTN5* e *CNTN6*, também foram associadas e suas vias patológicas se trataram de deficiências na função cerebral que afetam a emoção, a aprendizagem e a memória (HU *et al.*, 2015).

O gene *GRIK1* tem sido estudado desde 1998 no transtorno invasivo do desenvolvimento; dentre os genes com mutações relatadas descreveu-se o *GRIK1*, associado ao desenvolvimento e função normal do cérebro, sendo considerado como possível gene candidato no autismo e outras doenças neurocomportamentais (HALDEMAN-ENGLERT *et al.*, 1998). Em um estudo avaliando o ácido caínico (KA), um análogo da excitotoxina glutamato causador de degeneração neuronal (uma característica dos sintomas da doença de Alzheimer) revelou que o *knockdown* da expressão de receptores KA (KARs), como Grik1 e Grik3, induziu a supressão de dois componentes principais dos inflamassomas, a proteína 3 (*NLRP3*) do receptor semelhante ao domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeos (NOD) (*NLRP3*) e o fator nuclear (NF)- $\kappa$ B, sugerindo que os KARs funcionam a montante de *NLRP3* e NF- $\kappa$ B para mediar os efeitos de KA na regulação de *IL-1 $\beta$*  e expressão de *BDNF* (RUAN *et al.*, 2019).

Dentre os mRNAs não identificados na literatura, ou sem possíveis vias que podemos inferir associação à DA encontramos o *TAB3-AS2* diretamente envolvido em diversos tipos de câncer, exercendo função de supressor tumoral, o *LIMS1* participa da sinalização de integrina; um estudo relatou que a sua expressão induzida por inflamação leva à despolimerização da actina e má localização mitocondrial nos neurônios; o *FAM46C* que é um supressor tumoral em diversos tipos de câncer, inibindo a atividade da Plk4 pela via Wnt Caterina (KAZAZIAN *et al.*, 2020; NATARAJASEENIVASAN K. *et al.*, 2020; SHI, J. *et al.*, 2020)

### **5.3 Correlação de lncRNAs diferencialmente expressos com via biológicas conhecidas**

Apesar dos relatos existentes de lncRNAs com função associadas à etiologia da doença de Alzheimer, em nossos resultados foram encontrados 207 lncRNAs diferencialmente expressos que não possuem relatos nos bancos de dados investigados, onde 150 lncRNAs se encontra exclusivamente em LTL, 56 em PFC e 1 em ambos os tecidos (Figura 5). Considerando o cenário sobre a falta de informação funcional sobre esse conjunto de lncRNAs identificados como diferencialmente expresso em nossos resultados, utilizou-se um *pipeline* modificado de LIMA *et al.* (2019) para identificar possíveis pares de DE-mRNAs-lncRNAs co-expressos encontrados. A partir dos genes codificadores de proteínas pertencentes a vias metabólicas biológicas conhecidas e relacionadas à fisiopatologia da DA, tentou-se inferir função semelhante aos lncRNAs diferencialmente expressos.

Dessa forma, tentando encontrar lncRNAs com padrão de co-expressão (dentro de um mesmo módulo de co-expressão gerados pelas análises do webCEMiTool) e que estejam próximos (300 Kb a montante ou a jusante de mRNA diferencialmente expresso) visando inferir possíveis perfis de regulação em *cis* e função biológica relacionada com genes conhecidos em vias regulatórias relacionadas a DA.

Foram encontrados 5 módulos de co-expressão em dados derivados de PFC (Figura 8) e 3 módulos de co-expressão nos dados derivados de LTL (Figura 9).

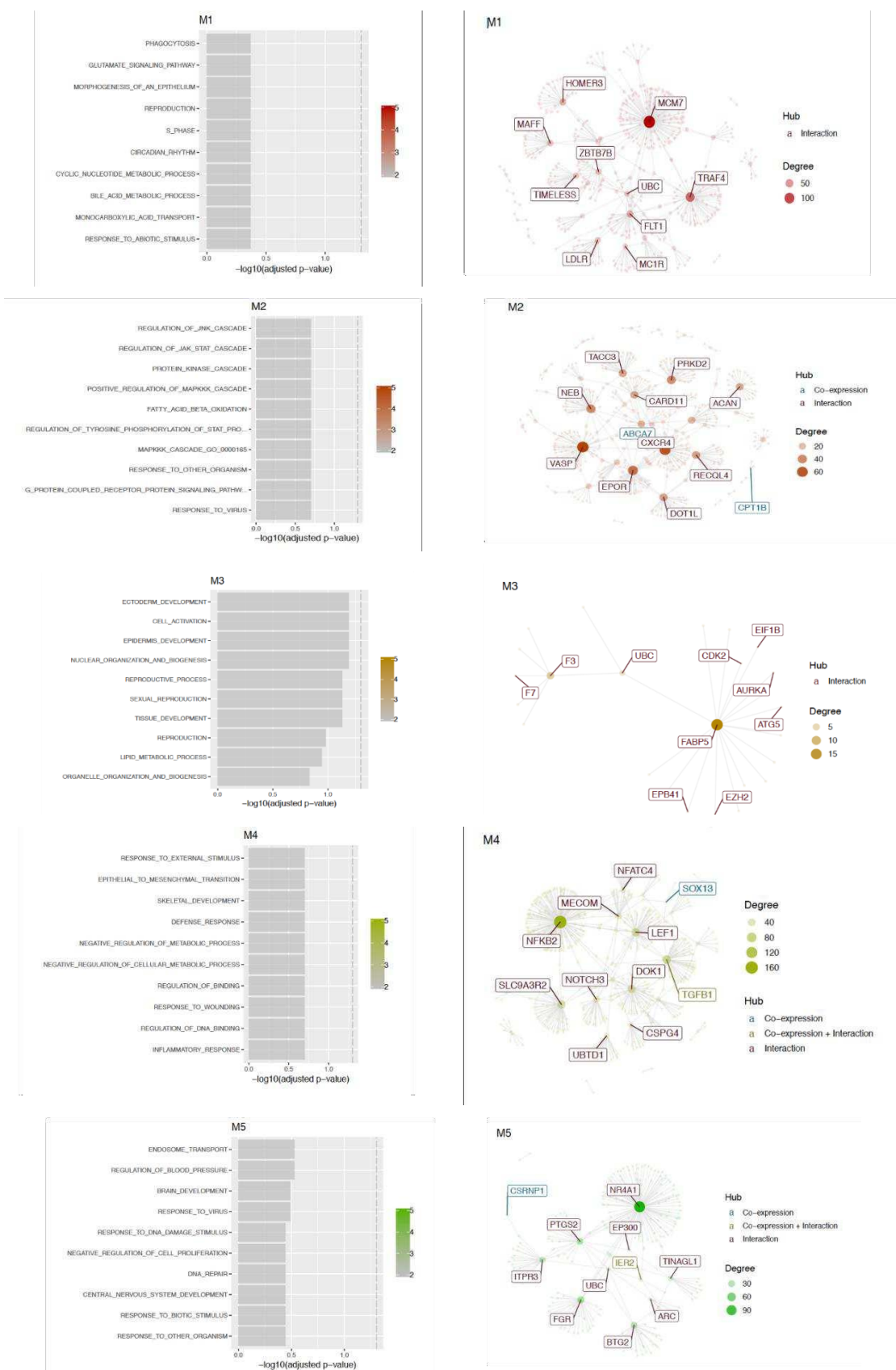


Figura 9: Redes de interação dos genes coexpressos dos módulos M1-M5 identificados na análise de PFC (AD x CTRL) pelo WebCEMiTool.



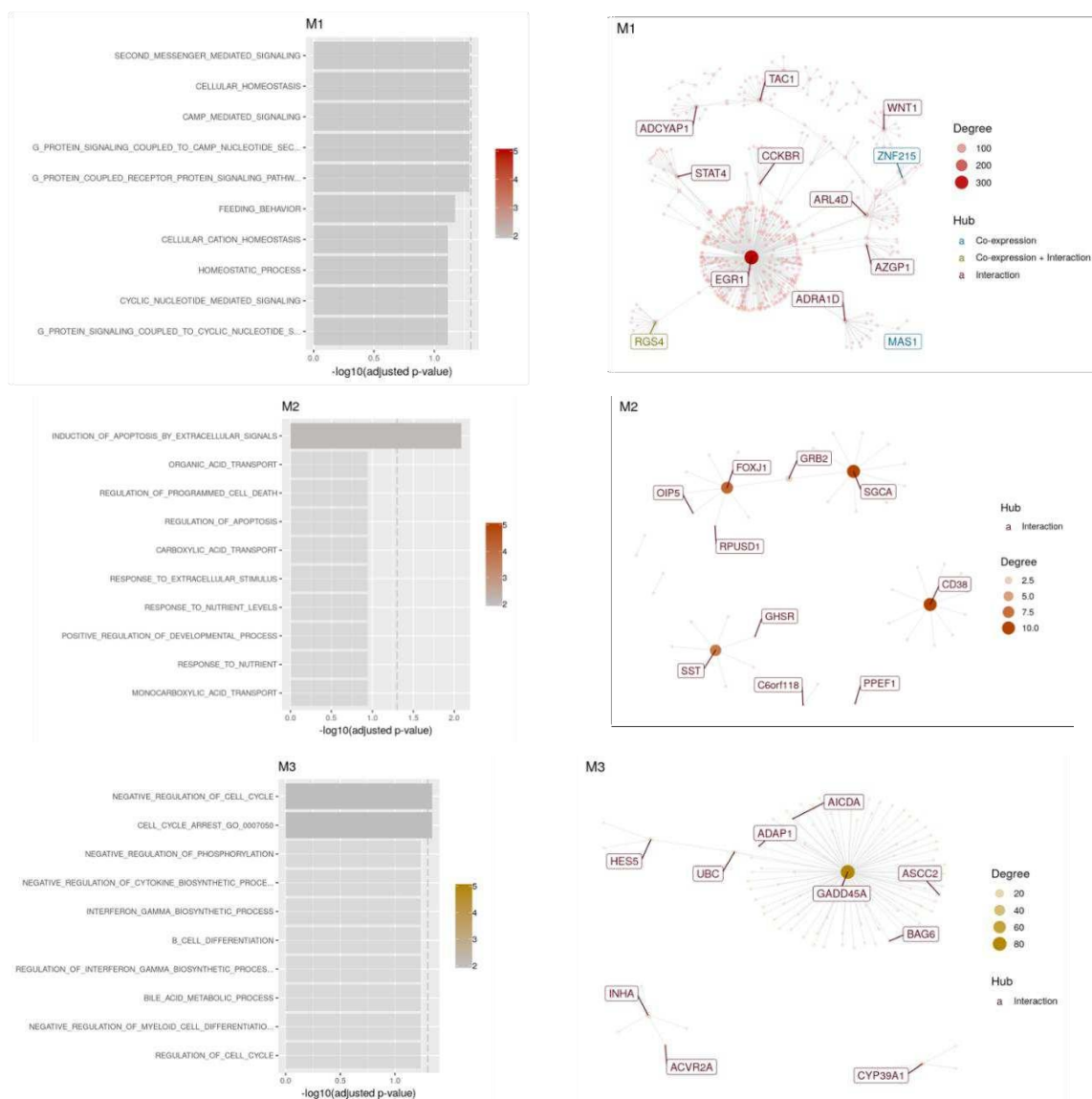


Figura 10: Redes de interação dos genes coexpressos dos módulos M1-M3 identificados na análise de LTL (AD x CTRL) nos resultados da análise pelo WebCEMiTool.

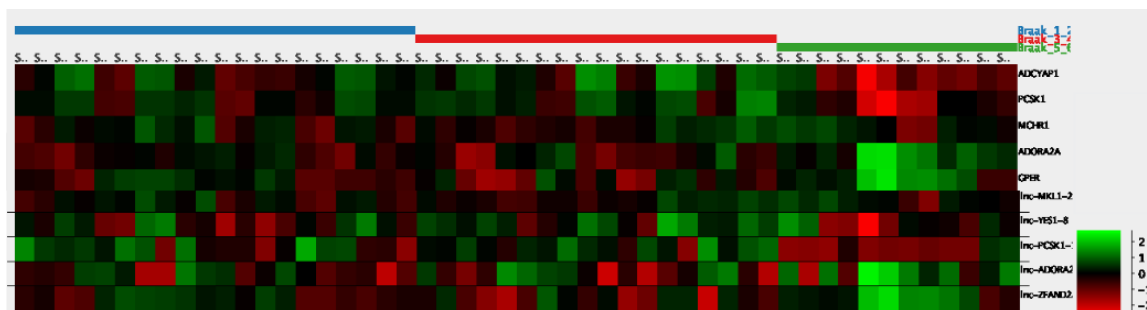
Os resultados da análise de ORA pelo webCEMiTool reportou diferentes vias biológicas relacionadas ao Alzheimer, entre elas, vias de resposta inflamatória e de sinalização acopladas aos receptores de proteínas-G (CHIDAMBARAM, H., CHINNANTHAMI, S. 2020; OH *et al.*, 2019). Quando avaliado lncRNAs dentro de uma localização 300 Kb a montante ou a jusante de genes codificadores nas vias encontradas nos resultados de ORA, foram encontrados 5 lncRNAs diferencialmente expressos, são eles: *ADORA2A-AS1* (antisense a *ADORA2A*), *Inc-PCSK1* (transcrito em orientação sense derivado de exon), *Inc-YES-1-8* (antisense a *ADCYAP1*), *Inc-ZFAND2A-1* e *Inc-MKL1-2* (Tabela 3 / Figura 10 A e B).

Tabela 3: Pares de mRNA/lncRNA incluindo módulo, coordenada cromossômica e característica estrutural do lncRNA.

mRNA/lncRNA	Módulo	Coordenada Cromossômica	Característica Estrutural lncRNA (LNCipedia)
<i>ADORA21/lnc-ADORA2A-AS</i>	M1	chr22: 24820377-24891042	<i>Antisense</i>
<i>PCSK1/lnc-PCSK1</i>	M1	chr5: 95726040 - 95768952	<i>Intergênico</i>
<i>GPER/lnc-ZFAND2A-1</i>	M2	chr7: 1131264-1133445	<i>Intrônico</i>
<i>ADCYAP/lnc-YES1-8</i>	M1	chr18: 903986-905041	<i>Antisense</i>
<i>MCHR1/lnc-MKL1-2</i>	M1	chr22: 40592997-40593215	<i>Antisense</i>

Todos esses lncRNAs se sobrepõem a genes codantes (antisense, intrônicos ou intergênicos), o que reforça a hipótese de que os mesmos podem influenciar na regulação de seus pares adjacentes.

A)



B)



Figura 11: *Heatmap* dos pares de mRNA/lncRNA encontrados nos resultados do webCEMiTool. (A) PFC analisadas (estágio: braak 1-2 - barra azul; braak 3-4 - barra vermelha; braak 5-6 - barra verde). (B) LTL analisadas (controle: indivíduos saudáveis /braak 1-2 - barra vermelha; AD braak 5-6 - barra azul). Dados representados em log<sub>2</sub> RPKM.

Meng, Wang e Li (2020) avaliaram a expressão de proteínas no soro de pacientes com DA e controle. As análises demonstraram expressão diferencial do mRNA *ADORA2A* (Receptor de Adenosina Acoplado à proteína G). Notou-se que *ADORA2A* é diferencialmente expresso (hiperexpresso) na DA e controla a função glial e adaptação metabólica no cérebro de pacientes com essa patologia (MENG, WANG, LI, 2020). Em nossa pesquisa, o lncRNA *ADORA2A-AS* também se encontrava hiperexpresso. Sendo assim, pode-se inferir que o lncRNA *ADORA2A-AS* também possa estar associado na resposta inflamatória neuronal ou mesmo em um possível mecanismo de regulação de *ADORA2A*.

O *ADCYAP1* é um gene codificador da proteína PACAP (Polipeptídeo Ativador da Adenilato Ciclase Pituitária) em humanos, um potente peptídeo neurotrófico e neuroprotetor no SNC (Sistema Nervoso Central). Um estudo realizado em 2015 apontou que a hipoexpressão de PACAP está associada à gravidade clínica nos estágios de comprometimento cognitivo e demência da Doença de Alzheimer (HAN *et al.*, 2015). Enquanto, um estudo realizado por WASCHEK (2013) confirmou a relevância desse peptídeo em processos neuro-inflamatórios. Os mesmos são receptores presentes em neurônios, astrócitos, microglia e células inflamatórias periféricas, exercendo a função de imunoproteção em casos de lesões neurodegenerativas (WACHEK, 2013).

O *lnc-YES1-8* é um lncRNA *antisense*, localizado no cromossomo 18 no mesmo domínio de expressão onde *ADCYAP1* se encontra. Os dados encontrados no presente estudo inferem que ambos seguem um padrão de hipoexpressão em pacientes com DA; sendo assim é possível que ambos estejam associados à mesma função biológica de neuroproteção.

Um estudo realizado em 2014 demonstrou que os perfis de expressão em cérebros humanos *post mortem* em pacientes portadores de DA, apresentando *downregulation* em *PCSK1* e outros 11 genes associados a vias metabólicas, o que poderia se relacionar com comprometimento cognitivo (HOKAMA *et al.*, 2014). Esta é a principal enzima de processamento de proteínas precursoras na via secretora. Além disso, o gene *PCSK1* também implica na via leptina-melanocortina, estando associado à obesidade e doenças neurodegenerativas e do neurodesenvolvimento (FLORES-DORANTES *et al.*, 2020). A função normal desta via hipotalâmica é essencial para o controle do balanço energético (CLÉMENT; MOSBAH; POITOU, 2020). Diversas evidências sugerem que a obesidade e a diabetes combinada com

o envelhecimento contribuem para a susceptibilidade de um indivíduo para o desenvolvimento da DA por diversas vias: estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e inflamação crônica (Figura 10) (PUGAZHENTHI; QIN; REDDY, 2017). Nessa pesquisa encontrou-se o lncPCSK1, um lncRNA intergênico, sendo regulado pelo mesmo módulo do gene *PCSK1*, responsável pela geração de respostas inflamatórias.

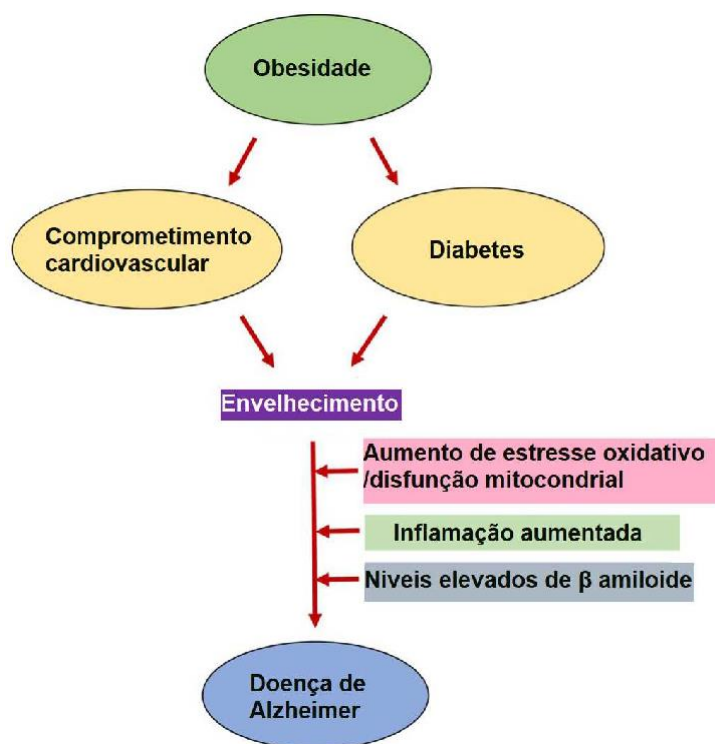


Figura 12: Vias comuns de distúrbios associados ao envelhecimento. O risco de doença de Alzheimer (DA) em idosos é aumentado por outras comorbidades associadas ao envelhecimento, incluindo obesidade, diabetes e comprometimento cardiovascular. Estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e inflamação crônica observadas nessas condições também são algumas das causas importantes da DA. Fonte: Pugazhenthhi; Qin; Reddy, 2017 (Adaptado pelo autor).

As proteínas G estão incluídas em uma superfamília de proteínas. Elas se encontram acopladas a receptores no meio intracelular. Portanto, suas funções principais estão associadas à transdução de sinais (MOURA, P., VIDAL, F., 2011). Na DA, os GPCRs (Receptores acoplados à proteína G) estão envolvidos tanto na fosforilação da Tau através de várias quinases a jusante, como a cascata de sinalização GSK-3 $\beta$ , CDK-5 e ERKs (CHIDAMBARAM, H., CHINNANTHAMI, S. 2020). Assim como o receptor de melatonina acoplado à proteína G, possui associação com a DA por estar relacionado com as vias de ativação sono-vigília (ROQUE, C. *et al*, 2019).

A proteína G também está associada aos receptores de estrogênio, hormônios que desempenham um papel crítico durante o desenvolvimento e crescimento para o funcionamento adequado do sistema reprodutivo da mulher, bem como para a manutenção dos ossos, metabolismo e cognição. No cérebro, a redução das vias moleculares mediadas por receptores estrogênicos parece favorecer a progressão da doença de DA em mulheres na pós-menopausa (BARRIENTOS *et al.*, 2021).

Como observado nos resultados, o *Inc-ZFAND2A-1* foi demonstrado ser co-expresso no mesmo módulo do gene *GPER* (Receptor de Estrogênio acoplado à proteína G).

Assim como os receptores de estrogênio são distribuídos de forma ubíqua, eles podem modular a proliferação, diferenciação e sobrevivência celular em vários tecidos e órgãos, incluindo o SNC. Os estrogênios podem exercer funções neuroprotetoras atuando como antioxidantes, promovendo o reparo do DNA, induzindo a expressão de fatores de crescimento e modulando o fluxo sanguíneo cerebral. Além disso, as vias de sinalização dependentes de estrogênio estão envolvidas na regulação do equilíbrio entre proliferação e diferenciação de células-tronco/progenitoras neurais (NSPCs), influenciando assim os processos neurogênicos. (TECALCO-CRUZ *et al.*, 2021). O gene que codifica estes receptores é o *GPER*, e nos achados dessa análise o mesmo se encontrava no módulo 2, em conjunto com o lncRNA intrônico *Inc-ZFAND2A-1* que está localizado no cromossomo 7.

O gene *MCHR1* codifica receptor 1 do hormônio concentrador de melanina, também conhecido por (MCH), um polipeptídeo hipotalâmico que promove a regulação do sono-vigília e da homeostase energética, tendo assim impacto no desempenho cognitivo. Essas também são características presentes em pacientes com DA. Schmidt *et al.* (2013) reportaram que níveis elevados de MCH em pacientes que sofrem de DA, possuem correlação com a proteína TAU e gravidade da doença. Também concluíram que a redução no MCH-R (receptor do hormônio concentrador de melanina) pode afetar o desempenho na aprendizagem e na memória, a potencialização da transmissão sináptica hipocampal pela infusão de MCH (SCHIMDT *et al.*, 2013). Um estudo recente esclareceu, por meio da administração de MCH em camundongos com deficiência de memória induzida para examinar os efeitos agudos. Nesses modelos de DA, notaram uma melhoria

nas funções de memória e redução de placas beta-amilóides solúveis no córtex cerebral dos camundongos. Em ensaios *in vitro*, notaram que o MCH inibe a citotoxicidade induzida por beta-amilóide, indicando ter neuroprotetor (OH *et al*, 2019). No presente estudo foi identificado o *Inc-MKL 1-2* localizado no cromossomo 22 e classificado como antisense a *MCHR1*. Considerando os mecanismos de ação dos transcritos antisense (STATELLO *et al*, 2021) em seus genes sobrepostos, essa localização e padrão de expressão podem indicar uma possível associação às mesmas funções biológicas ou a regulação de de *MCHR1*.

Com base nos resultados de co-expressão gênica, cinco lncRNAs diferencialmente expressos foram encontrados sobrepostos ou vizinhos a genes codantes. Como tem sido relatado na literatura atual, o número avassalador de lncRNAs encontrados em estudos avaliando expressão diferencial em doenças humanas, especialmente em patologias associadas ao sistema nervoso, não possuem função esclarecida. Estudos de identificação desses lncRNAs constituem um passo inicial “*sine qua non*” para elucidar a função dos mesmos na DA e mesmo como identificação de moléculas com valor para o diagnóstico da doença de Alzheimer.

Futuros estudos de caracterização estrutural *in silico* e de análise funcional *in vitro*, permitiram elucidar a real contribuição dos dados de expressão de lncRNAs na doença de Alzheimer.

## 7. CONCLUSÃO

No presente estudo foram encontrados 207 lncRNAs diferencialmente expressos entre pacientes com Alzheimer (braak 5-6) e demais grupos (braak 1-3; braak 3-4) ou controles saudáveis

Apenas um lncRNA, o *lnc-MRPL57-9*, foi diferencialmente expresso tanto em amostras de PFC quanto de LTL. Até o presente momento não há informação sobre esse lncRNA e ainda não existem estudos associando-o com a DA. Apesar de ser necessário uma maior abordagem e pesquisa sobre esse lncRNA, o fato de ser o único expresso em ambos os tecidos estudados reforça a necessidade de estudos futuros que caracterizem a função do mesmo na DA, apresentando um potencial papel de biomarcador para essa patologia.

A expressão diferencial do lncRNA *LINC00473* sugere um possível papel na DA no sexo feminino, via sua relação com receptores de estrogênio acoplados à proteína G em mulheres pós-menopausa e sua função sexo específico no desenvolvimento de depressão.

Foram identificados 5 lncRNAs com padrão similar de co-expressão com genes codantes e, devido a sua localização genômica, é possível sugerir uma co-regulação em *cis* com os genes codantes vizinhos.

Dessa maneira, o presente estudo identificou não apenas lncRNAs já descritos na literatura, mas uma gama de novos RNAs de classe possivelmente associados a vias de resposta inflamatória que podem estar associados à etiologia da Doença de Alzheimer.

Finalizando, é importante ressaltar que 207 dos lncRNAs encontrados (90,82%) não possuem função definida e nenhum relato na literatura contemporânea.

O grande número de achados de DE-lncRNA tecido específico, indicam fortemente a necessidade de mais estudos sobre a função dos mesmos e, como esses contribuem ou não para a fisiopatologia da doença de Alzheimer.

## 8. REFERÊNCIAS

ACHAR A, GHOSH C. **COVID-19-Associated Neurological Disorders: The Potential Route of CNS Invasion and Blood-Brain Relevance**. *Cells*. 2020;9(11):2360. Published 2020 Oct 27.

ALEGRIA, R. **Análise de itens lexicais do discurso oral do paciente com doença de Alzheimer**. Tese Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Psicologia – Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2012.

ALMEIDA, O. P. Biologia molecular da doença de Alzheimer: uma luz no fim do túnel? **Rev Assoc Med Bras**, v. 43, n. 1, p. 77–81, 1997.

ALMEIDA, O. P.; SHIMOKOMAKI, C. M. APOLIPOPROTEIN E4 AND

ALZHEIMER'S DISEASE IN SÃO PAULO-BRAZIL. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 1, n. 55, 1997.

ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL. World Alzheimer Report 2019: **Attitudes to dementia**. Alzheimer's Disease International, London, Copyright © Alzheimer's Disease International, 2019.

ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL World Alzheimer Report 2015: **The Global Impact of Dementia**. Alzheimer's Disease International, London, Copyright © Alzheimer's Disease International, 2015.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (APS). (2014). **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais (DSM-5)** (5a ed., M. I. C. Nascimento, P. H. Machado, R. M. Garcez, R. Pizzato, S. M. M. Rosa, trads.). Porto Alegre, RS: Artmed

ANDRADE-MORAES, C. H. et al. Cell number changes in Alzheimer's disease relate to dementia, not to plaques and tangles. **Brain**, v. 136, n. 12, p. 3738–3752, 1 dez. 2013.

ANNESE, A. *et al.* **Whole transcriptome profiling of late-onset Alzheimer's disease patients provides insights into the molecular changes involved in the disease**. *Sci Rep*. 2018;8(1):4282.

APRAHAMIAN, I.; MARTINELLI, J. E.; YASSUDA, M. S. Doença de Alzheimer: revisão da epidemiologia e diagnóstico. **Rev. Soc. Bras. Clín. Méd**, p. 27–35, 2009.

APOSTOLAKOU *et al.* Extended Human G-Protein Coupled Receptor Network: **Cell-Type-Specific Analysis of G-Protein Coupled Receptor Signaling Pathways**. *J Proteome Res*. 2020 Jan 3;19(1):511-524.

ARMSTRONG, R. **Risk factors for Alzheimer's disease**. *Folia neuropathologica* vol. 57,2 (2019): 87-105.

BALLARD, C. et al. Alzheimer's disease. **Lancet (London, England)**, v. 377, n. 9770, p. 1019–1031, 2011.



BARRANCO *et al.* **Dense core vesicle markers in CSF and cortical tissues of patients with Alzheimer's disease.** *Transl Neurodegener.* 2021;10(1):37. Published 2021 Sep 26.

BARRIENTOS *et al.* **The Impact of Estrogen and Estrogen-Like Molecules in Neurogenesis and Neurodegeneration: Beneficial or Harmful?** *FrontCell Neurosci.* 2021 Mar 8;15:636176.

BARNES, D.E, YAFFE, K. **The projected effect of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence.** *The Lancet Neurology*; 2011.

BLENNOW, K.; DE LEON, M. J.; ZETTERBERG, H. **Alzheimer's disease.** *Lancet* (London, England), v. 368, n. 9533, p. 387–403, 29 jul. 2006.

BLOTTA, S. *et al.* **Identification of novel antigens with induced immune response in monoclonal gammopathy of undetermined significance.** *Blood*, v. 114, n. 15, p. 3276–3284, 2009.

BRAAK, H. *et al.*, 2006. **Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry.** *Acta neuropathologica* vol. 112,4 (2006): 389-404.

BRAAK, H., BRAAK, E. **Demonstration of amyloid deposits and neurofibrillary changes in whole brain sections.** *Brain Pathol.* 1991;1:213–216.

BENNETT, S., THOMAS, A.J. **Depression and dementia: cause, consequence or coincidence?.** *Maturitas.* 2014;79(2):184-190.

BIAN, *et al.* **The role of long noncoding RNA SNHG7 in human cancers (Review).** *Molecular and clinical oncology* vol. 13,5 (2020): 45.

BUSCHE, M.A., HYMAN, B.T. **Synergy between amyloid- $\beta$  and tau in Alzheimer's disease.** *Nat Neurosci.* 2020 Oct;23(10):1183-1193.

BOFF, M.S., SEKYIA, F.S., BOTTINO, C.M.C. **Revisão sistemática sobre prevalência de demência entre a população brasileira.** *Revista de Medicina.* 94. 154, 2015.

BOLLATI, V., BACCARELLI, A. **Environmental epigenetics.** *Heredity.* v. 105, p. 105-112, 2010.

BORELLI, E. *et al.* **Decoding the epigenetic language of neuronal plasticity.** *Neuron* 2008; 60:961-74.

BRIGGS, J.A *et al.* **Mechanisms of long non-coding RNAs in mammalian nervous system development, plasticity, disease, and evolution.** *Neuron.* 2015;88(5):861–877

BROOKES, E. & SHI, Y. **Diverse Epigenetic Mechanisms of Human Disease.** *Annual Review of Genetics.* v. 48, p. 237-268, 2014

CAÇÃO, J. D. C. *et al.* **Polimorfismo da apolipoproteína e nos familiares em primeiro grau de pacientes com doença de Alzheimer familiar ou esporádica.** *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, v. 65, n. 2 A, p. 295–298, 2007.

CARDOZO, L. *et al.* **webCEMiTool: Co-expression Modular Analysis Made Easy.** *Front Genet* . 2019 Mar 6;10:146.

CAO, Y. *et al.* **LncRNA PART1 promotes lung squamous cell carcinoma progression via miR-185-5p/Six1 axis.** *Human & experimental toxicology* vol. 40,6 (2021): 960-976. doi:10.1177/0960327120979032.

CAOM, L. *et al.* **Identification of age- and gender-associated long noncoding RNAs in the human brain with Alzheimer's disease.** *Neurobiol Aging*. 2019;81:116–126.

CARAMELLI, P. *et al.* **The Pietà study: epidemiological investigation on successful brain aging in Caeté (MG), Brazil. Methods and baseline cohort characteristics.** *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, v. 69, n. 4, p. 579–584, 2011.

CASTELLANI, R. J.; PERRY, G. **The complexities of the pathology-pathogenesis relationship in Alzheimer disease.** *Biochemical pharmacology*, v. 88, n. 4, p. 671–676, 15 abr. 2014.

CHANG *et al.* **NCK1-AS1 promotes NCK1 expression to facilitate tumorigenesis and chemo-resistance in ovarian cancer.** *Biochemical and biophysical research communications* vol. 522,2 (2020): 292-299.

CLÉMENT, K.; MOSBAH, H.; POITOU, C. **Rare genetic forms of obesity: From gene to therapy.** *Physiology & behavior*, v. 227, 1 dez. 2020.

CONGDON, E.E., SIGURDSSON, E.M. **Tau-targeting therapies for Alzheimer disease.** *Nat Rev Neurol*. 2018 Jul;14(7):399-415.

DAY & SWEATT. **Epigenetic mechanisms in cognition.** *Neuron*. 2011 Jun 9;70(5):813-29.

DINGFENG, L. *et al.* **Insights into lncRNAs in Alzheimer's disease mechanisms.** *RNA Biology*, 2020.

ERDMAN, V. V *et al.* [Role of PLAT, PKHD1L1, STK38L and TEAD1 genes Alu-polymorphism for longevity]. **Advances in gerontology = Uspekhi gerontologii**, v. 29, n. 5, p. 709–716, 2016.

FAGHIHIMA, *et al.* **Expression of a noncoding RNA is elevated in Alzheimer's disease and drives rapid feed-forward regulation of beta-secretase.** *Nat Med*. 2008; 14 (7): 723-730.

FENOGLIO, C. *et al.* **Role of Genetics and Epigenetics in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease and Frontotemporal Dementia.** *Journal of Alzheimer's disease : JAD* vol. 62,3 (2018): 913-932.

FERRARI, A. J. *et al.* **Burden of depressive disorders by country, sex, age, and year: findings from the global burden of disease study 2010.** *PLoS medicine*, v. 10, n. 11, nov. 2013.

FIGUEROA-ROMERO, C. *et al.* **Identification of epigenetically altered genes in sporadic amyotrophic lateral sclerosis.** *PloS one*, v. 7, n. 12, 29 dez. 2012.

FORMAN, M. S.; TROJANOWSKI, J. Q.; LEE, V. M. Y. **Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs.** *Nature Medicine* 2004 10:10, v. 10, n. 10, p. 1055–1063, 30 set. 2004.

FREITAS-SILVA, L.R., ORTEGA, F. **A epigenética como nova hipótese etiológica no campo psiquiátrico contemporâneo.** *Physis (Rio J.)* 2014; 24:765-86.

FRIDMAN, C., *et al.* **Alterações genéticas na doença de Alzheimer.** *Rev. psiquiatr. clín.*, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 19-25, 2004.

FU, XUEYAN, *et al.* **Long noncoding RNA PURPL promotes cell proliferation in liver cancer by regulating p53.** *Molecular medicine reports* vol. 19,6 (2019): 4998-5006.

GAO, F. *et al.* **Association of miR-182 expression in amniotic fluid with intrauterine infection and brain injury in premature infants.** *Experimental and therapeutic medicine*, v. 16, n. 3, p. 1905–1909, 1 set. 2018.

GAUTHIER,S. *et al.* **World alzheimer report 2021: journey through the diagnosis of dementia.** London, england: alzheimer's disease international. 2021.

GHAREGHANI, M. *et al.* **Melatonin Therapy Modulates Cerebral Metabolism and Enhances Remyelination by Increasing PDK4 in a Mouse Model of Multiple Sclerosis.** *Frontiers in pharmacology*, v. 10, n. FEB, 2019.

GIBNEY, E. R., NOLAN, C. M. **Epigenetics and gene expression.** *Heredity* vol. 105,1 (2010): 4-13.

GOLANSKA, E. *et al.* **Analysis of APBB2 gene polymorphisms in sporadic Alzheimer's disease.** *Neuroscience letters* vol. 447,2-3 (2008): 164-6.

GOLBABAPOUR, S. *et al.* **A concise review on epigenetic regulation: Insight into molecular mechanisms.** *International Journal of Molecular Sciences*. v. 12, p. 8661-8694, 2011.

GORDOVEZ, F.J.A., MCMAHON, F.J. **The genetics of bipolar disorder.** *Molecular psychiatry*, 25(3), 544–559.

GROEN, K. *et al.* **Erythrocyte microRNAs show biomarker potential and implicate multiple sclerosis susceptibility genes.** *Clinical and translational medicine*, v. 10, n. 1, p. 74–90, mar. 2020.

GU, C. *et al.* **LncRNA-mediated SIRT1/FoxO3a and SIRT1/p53 signaling pathways regulate type II alveolar epithelial cell senescence in patients with chronic obstructive pulmonary disease.** *Mol Med Rep.* 2017;15(5):3129-3134. doi:10.3892/mmr.2017.6367

GUILLEN-BURGOS, H. F., GUTIERREZ-RUIZ, K. **Genetic Advances in Post-traumatic Stress Disorder. Avances genéticos en el trastorno por estrés postraumático.** *Revista Colombiana de psiquiatria (English ed.),* 47(2), 108–118.

FARMER, K.M., GHAG, G., PUANGMALAI, N. *et al.* **P53 aggregation, interactions with tau, and impaired DNA damage response in Alzheimer's disease.** *acta neuropathol commun* 8, 132 (2020).

FLORES-DORANTES *et al.* **Environment and Gene Association With Obesity and Their Impact on Neurodegenerative and Neurodevelopmental Diseases.** *Frontiers in neuroscience* vol. 14 863. 28 Aug. 2020.

HALDEMAN-ENGLERT *et al.*, 1998. **A de novo 8.8-Mb deletion of 21q21.1-q21.3 in an autistic male with a complex rearrangement involving chromosomes 6, 10, and 21.** *American journal of medical genetics. Part A* vol. 152A,1 (2010): 196-202.

HAN *et al.* **Association of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide with cognitive decline in mild cognitive impairment due to Alzheimer disease.** *JAMA Neurol.* 2015 Mar;72(3):333-9.

HANG, L., CHEN, Y. **Small and Long Non-Coding RNAs: Novel Targets in Perspective Cancer Therapy.** *Curr Genomics.* 2015;16(5):319-326.

HAN, S., LI, X., WANG, K., *et al.* **PURPL represses autophagic cell death to promote cutaneous melanoma by modulating ULK1 phosphorylation.** *Cell Death Dis.* 2021;12(11):1070. Published 2021 Nov 10..

HAMDANE, M. *et al.* **Stable-Tau Overexpression in Human Neuroblastoma Cells.** *Annals of the New York Academy of Sciences,* 1010(1), 623–634. doi:10.1196/annals.1299.115

HE, Y. *et al.* **A Novel lncRNA Panel Related to Ferroptosis, Tumor Progression, and Microenvironment is a Robust Prognostic Indicator for Glioma Patients.** *Frontiers in cell and developmental biology* vol. 9 788451. 7 Dec. 2021.

HERMANS-BEIJNSBERGER, *et al.* **Long non-coding RNAs in the failing heart and vasculature.** *Non-coding RNA Research.* 3. 10.1016/j.ncrna.2018.04.002.

HIRAWAKE-MOGI, H.; THANH NHAN, N. T.; OKUWAKI, M. **G-patch domain-containing protein 4 localizes to both the nucleoli and Cajal bodies and regulates cell growth and nucleolar structure.** *Biochemical and biophysical research communications,* v. 559, p. 99–105, 25 jun. 2021.

HYMAN, B. T. *et al.* National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. **Alzheimer's &**

**dementia : the journal of the Alzheimer's Association**, v. 8, n. 1, p. 1–13, jan. 2012.

HOKAMA *et al.* **Altered expression of diabetes-related genes in Alzheimer's disease brains: the Hisayama study.** *Cereb. Cortex* 24 2476–2488. 10.1093/cercor/bht101

HU *et al.* **CNTN6 copy number variations in 14 patients: a possible candidate gene for neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders.** *J Neurodev Disord.* 2015;7(1):26.

HUA, J. T. *et al.* **Risk SNP-Mediated Promoter-Enhancer Switching Drives Prostate Cancer through lncRNA PCAT19.** *Cell*, v. 174, n. 3, p. 564- 575.e18, 26 jul. 2018.

HUANG *et al.* **Exosome-Derived LINC00960 and LINC02470 Promote the Epithelial-Mesenchymal Transition and Aggressiveness of Bladder Cancer Cells.** *Cells.* 2020;9(6):1419. Published 2020 Jun 7.

IDDA, M.L. *et al.* **Noncoding RNAs in Alzheimer's disease.** *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* vol. 9,2 (2018): 10.1002/wrna.1463.

INBAR-FEIGENBERG, M. *et al.* **Basic concepts of epigenetics.** *Fertility and sterility* vol. 99,3 (2013): 607-15.

ISLLER *et al.*, 2020. **Sex-Specific Role for the Long Non-coding RNA LINC00473 in Depression.** *Neuron* vol. 106,6 (2020): 912-926.e5.

LABONTÉ, B. *et al.* **Sex-specific transcriptional signatures in human depression.** *Nature medicine*, v. 23, n. 9, p. 1102–1111, 1 set. 2017.

LI, *et al.* **The Sequence Alignment/Map format and SAMtools.** *Bioinformatics*, Volume 25, Issue 16, 15 August 2009, Pages 2078–2079.

LI, Y. *et al.* **Genetic association of the APP binding protein 2 gene (APBB2) with late onset Alzheimer disease.** *Human mutation* vol. 25,3 (2005): 270-7. doi:10.1002/humu.20138.

LO, T. W. *et al.* **Extracellular Vesicles in Serum and Central Nervous System Tissues Contain microRNA Signatures in Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis.** *Frontiers in Molecular Neuroscience*, v. 14, 29 out. 2021.

LOU, t. *et al.* **Tingting et al. LncRNA PART1 facilitates the malignant progression of colorectal cancer via miR-150-5p/LRG1 axis.** *Journal of cellular biochemistry* vol. 121,10 (2020): 4271-4281. doi:10.1002/jcb.29635

MATTSON, M. P. **Pathways towards and away from Alzheimer's disease.** *Nature* 2004 430:7000, v. 430, n. 7000, p. 631–639, 5 ago. 2004.

NAJAFI, N.; PEYMANI, M. **A genetic variant of pri-miR-182 may impact the risk for the onset of multiple sclerosis in the Iranian population.** *American journal*

*of human biology : the official journal of the Human Biology Council*, v. 32, n. 6, 1 nov. 2020.

NI *et al.*, 2019. **Long noncoding RNA GAS5 inhibits progression of colorectal cancer by interacting with and triggering YAP phosphorylation and degradation and is negatively regulated by the m6A reader YTHDF3.** *Molecular cancer* vol. 18,1 143. 16 Oct. 2019, doi:10.1186/s12943-019-1079-y)

KARRAN, E., STROOPER, B. **The amyloid cascade hypothesis: are we poised for success or failure?** *Journal of neurochemistry*, 139 Suppl 2, 237–252. <https://doi.org/10.1111/jnc.13632>

IDDA, M.L; MUNK, R., ABDELMOHSEN K., *et al* **Noncoding RNAs in Alzheimer's disease.** *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2018 Mar;9(2):10.1002/wrna.1463. doi: 10.1002/wrna.1463. Epub 2018 Jan 12. PMID: 29327503; PMCID: PMC5847280.

JARROUX, J., MORILLON, A., PINKSKAYA, M, **History, Discovery, and Classification of lncRNAs.** *Adv Exp Med Biol*. 2017;1008:1-46. doi: 10.1007/978-981-10-5203-3\_1. PMID: 28815535.

KAROLCHIK, D., *et al.* **The UCSC Table Browser data retrieval tool.** *Nucleic acids research* vol. 32, Database issue (2004): D493-6. DOI:10.1093/nar/gkh103.

KAKUMANI, PAVAN KUMAR *et al.* **CSDE1 attenuates microRNA-mediated silencing of PMEPA1 in melanoma.** *Oncogene* vol. 40,18 (2021): 3231-3244. doi:10.1038/s41388-021-01767-9

KOPP, F., MENDELL, JT. **Functional Classification and Experimental Dissection of Long Noncoding RNAs.** *Cell*. 2018 Jan 25;172(3):393-407. doi: 10.1016/j.cell.2018.01.011. PMID: 29373828; PMCID: PMC5978744.

LENNON, M. C. **Work conditions as explanations for the relation between socioeconomic status, gender, and psychological disorders.** *Epidemiologic Reviews*, 17(1), 120-127. 1995.

LI, YANG, *et al.* **Long Non-coding RNA *IRAIN* Inhibits VEGFA Expression via Enhancing Its DNA Methylation Leading to Tumor Suppression in Renal Carcinoma.** *Frontiers in oncology* vol. 10 1082. 2 Sep. 2020, doi:10.3389/fonc.2020.01082.

LUCATELLI, *et al.* **Influência genética sobre a doença de Alzheimer de início precoce.** *Rev. psiquiatr. clín.*, São Paulo , v. 36, n. 1, 2009

KAZAZIAN *et al.* K, Haffani Y, Ng D, *et al.* **FAM46C/TENT5C functions as a tumor suppressor through inhibition of Plk4 activity.** *Commun Biol*. 2020;3(1):448. Published 2020 Aug 17. doi:10.1038/s42003-020-01161-3.

MAZZIO, E. A, SOLIMAN, K.F. **Basic concepts of epigenetics: impact of environmental signals on gene expression.** *Epigenetics*. 2012;7(2):119-130

MENG, S.X., WANG, B., LI, W.T.,. **Serum expression of EAAT2 and ADORA2A in patients with different degrees of Alzheimer's disease.** *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2020 Nov;24(22):11783-11792. doi: 10.26355/eurrev\_202011\_23833. PMID: 33275249.

MCKHANN, et al. **The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease.** *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association*, 7(3), 263–269. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.005>

MOURA, P., VIDAL, F. **Transdução de sinais: uma revisão sobre proteína G.** *Scientia Medica* (Porto Alegre) 2011; volume 21, número 1, p. 31-36

NATARAJASEENIVASAN K. *et al.* **Inflammation-induced PINCH expression leads to actin depolymerization and mitochondrial mislocalization in neurons.** *Transl Neurodegener.* 2020;9(1):32. Published 2020 Aug 3. doi:10.1186/s40035-020-00211-4).

NESTLER, E. **Epigenetic mechanisms in psychiatry.** *Biol Psychiatry* 2009; 65:189-90.

NUSSBAUM, *et al.* **Thompson & Thompson: Genética Médica.** 7ª ed. Rio de Janeiro, 2008.

OH et al. **Nasal Cavity Administration of Melanin-Concentrating Hormone Improves Memory Impairment in Memory-Impaired and Alzheimer's Disease Mouse Models.** *Mol Neurobiol.* 2019 Dec;56(12):8076-8086. doi: 10.1007/s12035-019-01662-1. Epub 2019 Jun 10. PMID: 31183806.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Classificação de Transtornos Mentais e de Comportamento da Cid-10 - Descrições Clínicas e Diretrizes Diagnósticas.** Porto Alegre: Artmed. 2002.

OKASAKI, S., NUMATA, S., OTSUKA, I. *et al.* **Decelerated epigenetic aging associated with mood stabilizers in the blood of patients with bipolar disorder.** *Transl Psychiatry* 10, 129 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41398-020-0813-y>

PEÇANHA, M., NERI, V. **Estudo neuropatológico e funcional da Doença de Alzheimer.** *Rev Científica da FMC.* Vol 2. N 1. 2007.

PHILIPSON, O.; LORD A, GUMUCIO, A.; O' CALLAGHAN, P.; LANNFELT, L.; NILSSON, L.N. **Animal models of amyloid-beta-related pathologies in Alzheimer's disease.** *Febs Journal* 277:1389-1409, 2010

PONTING, C.; OLIVER, P.; REIK, W. **Evolution and functions of long noncoding RNAs.** *Cell*, 136(4):629–641, February 2009. 1, 19, 22.  
PUGAZHENTHI, S.; QIN, L.; REDDY, P. H. **Common Neurodegenerative Pathways in Obesity, Diabetes, and Alzheimer's Disease.** *Biochimica et biophysica acta*, v. 1863, n. 5, p. 1037, 1 maio 2017.

QUIN, J.J., CHANG, H.Y. **Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function.** *Nat Rev Genet.* 2016 Jan;17(1):47-62. DOI: 10.1038/nrg.2015.10. PMID: 26666209.

QIU, DONGXU, *et al.* **PMEPA1 Is a Prognostic Biomarker That Correlates With Cell Malignancy and the Tumor Microenvironment in Bladder Cancer.** *Frontiers in immunology* vol. 12 705086. 28 Oct. 2021, doi:10.3389/fimmu.2021.705086.

REITZ, C.; MAYEUX, R. Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. **Biochemical pharmacology**, v. 88, n. 4, p. 640–651, 15 abr. 2014.

RIBEIRO, H. *et al.* **Doença de Alzheimer de início precoce (DAIP): características neuropatológicas e variantes genéticas associadas..** *Revista de Neuro-Psiquiatria*, 84(2), 113-127. <https://dx.doi.org/10.20453/rnp.v84i2.3998>.

ROBISON, A.J., NESTLER, E. J. **Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction.** *Neuroscience.* v. 12, p. 623- 637, 2011

ROQUE, C. *et al.* **The role of G protein-coupled estrogen receptor 1 on neurological disorders.** *Front Neuroendocrinol.* 2019 Oct;55:100786. doi: 10.1016/j.yfrne.2019.100786. Epub 2019 Sep 9. PMID: 31513775.

ROMMY, *et al.* **Role of TGF $\beta$  signaling in the pathogenesis of Alzheimer's disease.** *Frontiers in cellular neuroscience* vol. 9 426. 28 Oct. 2015, doi:10.3389/fncel.2015.00426

SAUNDERS, A. M. *et al.* **Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease.** *Neurology*, v. 43, n. 8, p. 1467–1472, 1993.

SCHIMDT *et al.* **Cerebrospinal fluid melanin-concentrating hormone (MCH) and hypocretin-1 (HCRT-1, orexin-A) in Alzheimer's disease.** *PLoSOne.* 2013 May 7;8(5):e63136. doi: 10.1371/journal.pone.0063136. Erratum in: *PLoSOne.* 2013;8(6). doi:10.1371/annotation/7a79c40c-c1c2-41eb-a894-614c12e8c056. PMID: 23667582; PMCID: PMC3646736.

SEEDAT, S. *et al.* **Cross-national associations between gender and mental disorders in the World Health Organization World Mental Health Surveys.** *Archives of general psychiatry*, v. 66, n. 7, p. 785–795, jul. 2009.

SERENIKI, A., VITAL, M.A.B.F. **A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos.** *Rev. psiquiatr. Rio Gd. Sul*, Porto Alegre , v. 30, n. 1, supl. 2008. DOI: 10.1590/S0101-81082008000200002.

SHARAD, SHASHWAT *et al.* **PMEPA1 Gene Isoforms: A Potential Biomarker and Therapeutic Target in Prostate Cancer.** *Biomolecules* vol. 10,9 1221. 22 Aug. 2020, doi:10.3390/biom10091221.



SHI, J. *et al.* **FAM46C suppresses gastric cancer by inhibition of Wnt/beta-catenin.** *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2020;25(3):549-563. Published 2020 Jan 1. doi:10.2741/4820.

SIGAL, D. S. *et al.* **Comprehensive genomic profiling identifies novel NTRK fusions in neuroendocrine tumors.** *Oncotarget*, v. 9, n. 88, p. 35809–35812, 9 nov. 2018.

SOUZA, R. K. M. DE *et al.* **Prevalence of dementia in patients seen at a private hospital in the Southern Region of Brazil.** *Einstein (Sao Paulo, Brazil)*, v. 18, p. eAO4752, 2019

STATELLO *et al.* **Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 22, 96–118 (2021). DOI: 10.1038/s41580-020-00315-9.

SWEATT, J.D. **Experience-dependent epigenetic modifications in the central nervous system.** *Biol Psychiatry* 2009; 65:191-7.

TEIPEL, S. J. *et al.* **Relevance of magnetic resonance imaging for early detection and diagnosis of Alzheimer disease.** *The Medical clinics of North America*, v. 97, n. 3, p. 399–424, maio 2013.

TEIXEIRA, J.B. *et al.* **Dença de Alzheimer: estudo da mortalidade no Brasil, 2000-2009.** *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro , v. 31, n. 4, p. 850-860, abr. 2015. DOI: 10.1590/0102-311X00144713

TIAN *et al.* **AKT-induced lncRNA VAL promotes EMT-independent metastasis through diminishing Trim16-dependent Vimentin degradation.** *Nat Commun*. 2020;11(1):5127. Published 2020 Oct 12. doi:10.1038/s41467-020-18929-0

TCHURIKOV, N.A. **Molecular mechanisms of epigenetics.** *Biochemistry (Mosc)*. 2005 Apr;70(4):406-23. DOI: 10.1007/s10541-005-0131-2. PMID: 15892607.

TECALCO-CRUZ *et al.* **Estrogenic hormones receptors in Alzheimer's disease.** *Mol Biol Rep*. 2021 Nov;48(11):7517-7526. doi: 10.1007/s11033-021-06792-1. Epub 2021 Oct 16. PMID: 34657250.

UNITED NATIONS. **World Population Prospects: The 2017 Revision, World Population 2017 Wallchart.** ST/ESA/SER. A/398. Citation: United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2017).

VALENTE *et al.* **Autopercepção de saúde em cuidadores familiares de pacientes com demência: fatores sociodemográficos e clínicos.** *Arquivos de Neuro-Psiquiatria* 2011; 69(5):739-744.

VANDENBERGHE, R. *et al.* **Amyloid PET in clinical practice: Its place in the multidimensional space of Alzheimer's disease.** *NeuroImage : Clinical*, v. 2, n. 1, p. 497, 2013.

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, 30 set. 2004

WANG, *et al.* **Hepatocellular carcinoma risk variant modulates lncRNA HLA-DQB1-AS1 expression via a long-range enhancer-promoter interaction.** *Carcinogenesis*. 2021;42(11):1347-1356. doi:10.1093/carcin/bgab095)

WANG, J., SUN, J., YANG, F. **The role of long non-coding RNA H19 in breast cancer.** *Oncol Lett*. 2020 Jan;19(1):7-16. DOI: 10.3892/ol.2019.11093. Epub 2019 Nov 14. PMID: 31897110; PMCID: PMC6924119.

WANG, *et al.* **Construction and Analysis of a circRNA-Mediated ceRNA Network in Lung Adenocarcinoma.** *OncoTargets and therapy*, v. 14, p. 3659–3669, 2021.

WANG *et al.* **Long Noncoding RNA LINC01134 Promotes Hepatocellular Carcinoma Metastasis via Activating AKT1S1 and NF- $\kappa$ B Signaling.** *Frontiers in cell and developmental biology* vol. 8 429. 12 Jun. 2020, doi:10.3389/fcell.2020.00429

WASCHEK, J.A. **VIP and PACAP: neuropeptide modulators of CNS inflammation, injury, and repair.** *Br J Pharmacol*. 2013 Jun;169(3):512-23.

WATSON, C; BELLI, A.; PIETRO, V. **Small min-Codina RNAs: New Class of Biomarkers and Potential Therapeutic Targets in Neurodegenerative Disease.** *Genet*. 2019. DOI: 10.3389/fgene.2019.00364.

WEI, Y. **Comparative transcriptome analysis of the hippocampus from sleep-deprived and Alzheimer's disease mice.** *Genetics and molecular biology*, v. 43, n. 2, 2020.

WOLFFE, A.P., GUSCHIN, D. **Chromatin structural features and targets that regulate transcription.** *Journal of Structural Biology*. v. 129, p. 102-122, 2000.

XIE, Y. HUA; HU, J. **Suppression of long non-coding RNA PCAT19 inhibits glioma cell proliferation and invasion, and increases cell apoptosis through regulation of MELK targeted by miR-142-5p.** *Genes & genomics*, v. 42, n. 11, p. 1299–1310, 1 nov. 2020.

XU, S.; GUO, J.; ZHANG, W. **lncRNA PCAT19 promotes the proliferation of laryngocarcinoma cells via modulation of the miR-182/PDK4 axis.** *Journal of cellular biochemistry*, v. 120, n. 8, p. 12810–12821, 1 ago. 2019.

ZHANG, L., LU, Q., CHANG, C. **Epigenetics in Health and Disease.** *Adv Exp Med Biol*. 2020;1253:3-55. doi: 10.1007/978-981-15-3449-2\_1. PMID: 32445090.

ZHANG *et al.* **Silenced lncRNA H19 and up-regulated microRNA-129 accelerates viability and restrains apoptosis of PC12 cells induced by A $\beta$ 25-35 in a cellular model of Alzheimer's disease.** *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* vol. 20,1 (2021): 112-125. doi:10.1080/15384101.2020.1863681

ZHENG, *et al.* **Long intergenic noncoding RNA01134 accelerates hepatocellular carcinoma progression by sponging microRNA-4784 and**

**downregulating structure specific recognition protein 1.** *Bioengineered* vol. 11,1 (2020): 1016-1026. doi:10.1080/21655979.2020.1818508

ZHOUX, X. **Identification of Alzheimer's disease-associated long noncoding RNAs.** *Neurobiol Aging*. 2015;36(11):2925–2931.

**APÊNDICE A – lncRNAs diferencialmente expressos no LTL e PFC após a análise realizada pelo software SeqMonk, seguido de suas coordenadas cromossômicas e classificação segundo o LNCipedia.**

Probe (LTL)	Chromosome	Start	End	Classificação segundo LNCipedia
lnc-PEX10-4	1	2378280	2385896	antisense
LINC01767	1	56880603	56886056	antisense
LINC01134	1	3806828	3836605	antisense
lnc-PLPP3-12	1	56620217	56943359	sense_intronic_ncRNA
lnc-FAAH-1	1	46897801	46910993	lincRNA
lnc-MIXL1-7	1	226257217	226257654	sense_intronic_ncRNA
lnc-OPTC-2	1	203482142	203501704	lincRNA
lnc-RAB25-1	1	156052391	156063602	sense_intronic_ncRNA
lnc-HIST2H2AA4-1	1	149817383	149818053	lincRNA
lnc-MEX3A-1	1	156052672	156069658	antisense
lnc-PHF13-1	1	6663213	6665864	antisense
lnc-HIST2H2AA3-1	1	149816065	149820591	lincRNA
lnc-KHDRBS1-4	1	32398621	32399576	antisense
lnc-PCGF1-1	2	74725815	74726494	sense_intronic_ncRNA
lnc-CALM2-9	2	47533482	47533950	lincRNA
lnc-IKZF2-6	2	213861104	213862852	lincRNA
lnc-TWIST2-3	2	240105055	240106336	antisense
lnc-IKZF2-7	2	213839811	213857277	lincRNA
lnc-CALM2-11	2	47566684	47569195	lincRNA
lnc-EPCAM-2	2	47452932	47468722	lincRNA
lnc-GBX2-1	2	236736121	236736363	antisense
lnc-ACKR3-10	2	236736121	236736363	sense_intronic_ncRNA
lnc-CALM2-2	2	47419544	47572296	bidirectional
lnc-GIGYF2-3	2	233514559	233514845	sense_intronic_ncRNA
lnc-EPCAM-8	2	47552997	47571656	lincRNA
lnc-CALM2-8	2	47532963	47533189	lincRNA
lnc-PELI1-3	2	64503035	64503985	lincRNA
lnc-PP2D1-2	3	20211553	20212759	sense_intronic_ncRNA
lnc-KAT2B-5	3	20202876	20210905	antisense

Probe (LTL)	Chromosome	Start	End	Classificação segundo LNCipedia
lnc-RPP14-3	3	58386274	58386568	sense_intronic_ncRNA
lnc-TFDP2-6	3	141655549	141657389	lincRNA
lnc-TF-12	3	133503622	133515484	sense_intronic_ncRNA
lnc-ACTR8-3	3	53868060	53870643	sense_intronic_ncRNA
lnc-LEKR1-42	3	156855762	156860654	lincRNA
lnc-MFSD1-3	3	158587689	158589595	lincRNA
lnc-SH3BP2-1	4	2763548	2771553	lincRNA
LINC01338	5	82145082	82155888	lincRNA
lnc-ZNF608-20	5	72419231	124748974	lincRNA
lnc-GRM6-5	5	178541290	178549840	sense_intronic_ncRNA
lnc-SLC4A9-1	5	139761064	139766336	lincRNA
lnc-CEP72-1	5	667579	668841	antisense
lnc-ZDHHC11-1	5	858994	860350	sense_intronic_ncRNA
lnc-UQCC2-2	6	33707072	33709391	sense_intronic_ncRNA
lnc-RPL10A-1	6	35510171	35582533	lincRNA
lnc-NT5E-9	6	86353418	86355002	antisense
lnc-ARMC12-1	6	35620387	35621424	antisense
lnc-PRICKLE4-1	6	41688134	41701770	antisense
lnc-PXDC1-15	6	3884439	3913082	lincRNA
lnc-HEBP2-2	6	138736169	138743334	sense_intronic_ncRNA
lnc-IL17A-4	6	52257087	52258349	sense_intronic_ncRNA
lnc-TREM2-1	6	4113779	41145579	lincRNA
lnc-SLC25A13-1	7	96250839	96293650	sense_intronic_ncRNA
lnc-RNF216-1	7	5653430	5656062	lincRNA
lnc-TPD52-1	8	80944959	80945535	sense_intronic_ncRNA
lnc-PPP2R2A-1	8	26280109	26281445	sense_intronic_ncRNA
lnc-GRHL2-19	8	101920389	101925408	lincRNA
lnc-FIBCD1-2	9	133813404	133814673	Não classificado
lnc-C9orf66-4	9	747413	761551	lincRNA
lnc-SYK-7	9	93833251	93834014	lincRNA
lnc-TMEM250-3	9	138951445	138952261	sense_intronic_ncRNA

Probe (LTL)	Chromosome	Start	End	Classificação segundo LNCipedia
lnc-BRD3-8	9	137277363	137284375	antisense
lnc-KANK1-1	9	746431	751056	lincRNA
lnc-AUH-4	9	93736514	93747020	lincRNA
lnc-EGFL7-3	9	139437333	139438287	Não classificado
lnc-PRKACG-2	9	71780235	71785971	antisense
LINC00484	9	93881344	93971567	lincRNA
lnc-PTCH1-9	9	97933398	98079991	sense_intronic_ncRNA
lnc-AUH-2	9	93769562	93925559	lincRNA
lnc-UGCG-1	9	114582193	114586602	lincRNA
lnc-BRD3OS-2	9	136919392	136924173	antisense
lnc-FRMD3-1	9	86188943	86190093	lincRNA
lnc-TSPAN15-1	10	71289826	71303953	lincRNA
lnc-CNNM2-1	10	104674342	104675161	lincRNA
lnc-WDR37-5	10	1257858	1262572	antisense
lnc-NEUROG3-1	10	71296260	71297873	lincRNA
lnc-CLMP-8	11	123237668	123243374	antisense
lnc-DENND5A-1	11	9137687	9142948	sense_intronic_ncRNA
lnc-LTBP3-3	11	65254018	65256453	lincRNA
lnc-LTBP3-9	11	65263733	65264890	lincRNA
lnc-ATG16L2-10	11	72419231	72419610	antisense
lnc-HRAS-2	11	555660	558420	sense_intronic_ncRNA
lnc-TRPT1-4	11	63849098	63853552	sense_intronic_ncRNA
lnc-JHY-7	11	123229333	123238126	sense_intronic_ncRNA
lnc-HVCN1-2	12	111146204	111152944	lincRNA
lnc-NCOR2-5	12	125044838	125052756	sense_intronic_ncRNA
lnc-SCARB1-5	12	124996495	124998315	sense_intronic_ncRNA
FZD10-DT	12	130606749	130646910	bidirecional
lnc-PHC1-1	12	9109040	9111918	sense_intronic_ncRNA
lnc-NRIP2-3	12	2870366	2880835	lincRNA
lnc-CACNA2D4-2	12	1804996	1807210	antisense
lnc-MDM2-1	12	69307584	69307802	antisense

Probe (LTL)	Chromosome	Start	End	Classificação segundo LNCipedia
lnc-RBMS2-5	12	57040117	57040490	lincRNA
LINC02397	12	92815307	92889395	antisense
lnc-H2AFJ-0	12	14545417	14545920	sense_intronic_ncRNA
LINC00463	13	25746962	25754217	lincRNA
lnc-ZDHC20-6	13	21922929	21929241	lincRNA
lnc-ZDHC20-5	13	21930576	21935682	lincRNA
lnc-MRPL57-9	13	21932512	21933453	lincRNA
lnc-IFT88-2	13	21100114	21101433	lincRNA
lnc-LHFPL6-3	13	39783260	39790406	lincRNA
lnc-CCDC177-5	14	70258997	70263055	sense_intronic_ncRNA
lnc-HEATR4-8	14	74047158	74056796	lincRNA
lnc-NRDE2-4	14	90845381	90849517	lincRNA
lnc-GTF2A1-78	14	81478443	81636758	antisense
lnc-SRSF5-3	14	70265065	70266679	lincRNA
lnc-OTX2-10	14	56770208	56777479	lincRNA
lnc-PML-1	15	74342347	74346215	lincRNA
lnc-ST8SIA2-1	15	93124020	93143775	lincRNA
lnc-DNAAF4-1	15	55802948	55806712	lincRNA
lnc-FAM174B-1	15	93135601	93147549	lincRNA
lnc-GDPGP1-5	15	90735154	90736795	sense_intronic_ncRNA
lnc-HERC1-5	15	63792936	63795282	lincRNA
lnc-DENND4A-6	15	66319582	66321724	sense_intronic_ncRNA
lnc-PTX4-4	16	1603656	1604131	sense_intronic_ncRNA
lnc-SCNN1B-2	16	23419191	23420833	antisense
lnc-CA5A-9	16	87991977	87992387	antisense
lnc-SLC38A8-4	16	83754724	83806541	antisense
lnc-CCDC154-2	16	1509456	1510252	sense_intronic_ncRNA
lnc-NFAT5-6	16	69760437	69766902	antisense
lnc-ABAT-2	16	8757970	8763979	lincRNA
lnc-GLG1-3	16	74445251	74446697	sense_intronic_ncRNA
lnc-CRK-1	17	1320861	1323954	lincRNA

Probe (LTL)	Chromosome	Start	End	Classificação segundo LNCipedia
lnc-NGFR-3	17	47438523	47554350	antisense
lnc-TMEM105-5	17	79389672	79390846	antisense
lnc-SRCIN1-1	17	36604717	36609907	antisense
lnc-MYO15B-3	17	73561174	73563545	sense_intronic_ncRNA
lnc-SSTR2-5	17	71072769	71075140	antisense
lnc-SLC25A10-1	17	79690305	79691954	lincRNA
lnc-NR1D1-2	17	38295392	38296506	bidirectional
lnc-PAFAH1B1-3	17	2415315	2491107	lincRNA
lnc-PPP1R9B-2	17	48240884	48244194	antisense
lnc-COL1A1-6	17	48248789	48258539	antisense
lnc-APPBP2-6	17	58676329	58677370	bidirectional
lnc-OR7C1-1	19	14903302	14946188	sense_intronic_ncRNA
lnc-CIB3-3	19	16297087	16300269	antisense
lnc-NFKBID-1	19	36370792	36376739	lincRNA
lnc-LYL1-3	19	13180606	13182188	antisense
lnc-MAP2K2-2	19	4061613	4062747	sense_intronic_ncRNA
lnc-TP53TG5-5	20	44063702	44077080	antisense
lnc-KIZ-6	20	21246492	21247103	lincRNA
lnc-SAMSN1-2	21	16049036	16126186	lincRNA
lnc-RUNX1-6	21	37388377	37388844	lincRNA
lnc-TFF3-3	21	43654179	43654864	antisense
lnc-MIS18A-1	21	33632115	33633896	lincRNA
lnc-PDGFB-1	22	39608719	39610817	lincRNA
lnc-MCM5-1	22	35846034	35851349	lincRNA
LINC01546	X	3189861	3202694	lincRNA
lnc-ZDHHC9-2	X	129038467	129040053	bidirectional
lnc-PRPS1-3	X	106902187	106920484	lincRNA
lnc-MXRA5-8	X	3526666	3530322	sense_intronic_ncRNA
lnc-CXCR3-9	X	70799570	70802328	antisense



Probe (PFC)	Chromosome	Start	End	Classificação segundo LNCipedia
GAS5	1	173820423	173838144	antisense
Inc-COL9A2-12	1	40901871	40915711	Bidirecional
Inc-OR2T33-1	1	248343490	248344136	antisense
Inc-EPCAM-5	2	47445239	47448487	lincRNA
LINC01115	2	779837	864112	lincRNA
Inc-SNTG2-8	2	730359	744356	lincRNA
Inc-IRS1-7	2	227448955	227526727	lincRNA
Inc-DLX2-10	2	173538940	173539626	lincRNA
Inc-CNPPD1-1	2	220029300	220034779	sense_intronic_ncRNA
Inc-IRS1-8	2	227171583	227187109	lincRNA
Inc-TMEM18-17	2	769837	854112	lincRNA
Inc-TMEM18-19	2	885818	891142	lincRNA
Inc-MYH15-1	3	108039148	108045661	antisense
Inc-NDUFB4-1	3	120068294	120125125	antisense
NCK1-DT	3	136554947	136580984	antisense
Inc-ATP2C1-3	3	130396513	130396981	sense_intronic_ncRNA
Inc-FGFBP1-1	4	15852163	15857611	antisense
Inc-POLR2B-3	4	57823412	57824775	sense_intronic_ncRNA
Inc-FREM3-5	4	144318584	144325198	antisense
Inc-DCTD-11	4	183802930	183803356	lincRNA
Inc-FRG2-14	4	189935851	190285286	lincRNA
Inc-C5orf30-10	5	102847595	103318368	antisense
PURPL	5	27472376	27496508	lincRNA
PART1	5	59783540	59852635	antisense
Inc-KIF3A-66	5	132014777	132018321	antisense
Inc-RFPL4B-4	6	113201574	113204294	lincRNA
HLA-DOB1-AS1	6	32627657	32628506	antisense
Inc-HLA-DRB1-3	6	32627663	32630227	sense_intronic_ncRNA
Inc-TMEM229A-2	7	123977434	123992154	lincRNA

Probe (PFC)	Chromosome	Start	End	Classificação segundo LNCipedia
PVT1	8	128806769	129200457	lincRNA
lnc-FAM49B-8	8	131376783	131377961	sense_intronic_ncRNA
lnc-KHDRBS3-6	8	135732688	135736192	lincRNA
LNCOC1	8	143769637	143808418	antisense
GAS1RR	9	89562959	89629328	lincRNA
SNHG7	9	139614566	139622756	antisense
lnc-FRMD3-5	9	85594505	85597351	sense_intronic_ncRNA
lnc-HTR7-1	10	91936988	92426205	lincRNA
H19	11	2016360	2022940	lincRNA
lnc-USP28-6	11	113922104	113930141	bidirectional
lnc-USP35-7	11	78902603	78904205	antisense
lnc-IQSEC3-1	12	302202	303296	antisense
lnc-KSR2-1	12	117875576	117878382	sense_intronic_ncRNA
lnc-CMKLR1-3	12	108571891	108576038	antisense
LINC02470	12	10088931	10096094	lincRNA
lnc-C1QTNF9B-1	13	24481423	24523454	lincRNA
lnc-MRPL57-9	13	21932512	21933453	lincRNA
SNHG10	14	95993473	96001320	antisense
SALRNA2	15	70927588	70929653	lincRNA
SPATA41	15	100882748	100914028	lincRNA
IRAIN	15	99189092	99194450	antisense
SNHG21	15	83412975	83426861	lincRNA
lnc-CCL3-1	17	34415602	34417515	sense_intronic_ncRNA
lnc-SMIM36-5	17	53604325	53638452	lincRNA
lnc-MADCAM1-4	19	374497	375120	antisense
PCAT19	19	41959784	42007133	lincRNA
lnc-WRB-8	21	40499494	40499966	lincRNA