



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

Potencial terapêutico de miR-9 e miR-29 na doença de Alzheimer

Versão final após defesa

Bruno Miguel Cameira Baptista

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Biomédicas
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof^a. Doutora Fani Pereira de Sousa
Co-orientador: Doutora Patrícia Alexandra Nunes Pereira

Covilhã, novembro de 2018

Agradecimentos

Para a realização desta dissertação, contei com o apoio imprescindível e incondicional de inúmeras pessoas às quais estou profundamente grato.

Em primeiro lugar quero agradecer aos meus pais por tornarem isto possível, por todo o amor, amizade, paciência, força, apoio incondicional, compreensão, dedicação durante todos estes anos, sem nunca duvidar. Obrigado também por me ajudarem a nunca desistir, a perseguir os meus sonhos e objetivos, a estenderem sempre as suas duas mãos para me proporcionarem toda a ajuda quando mais precisei e nunca me deixarem cair.

À minha orientadora Prof^a. Doutora Fani Sousa, por toda a orientação cuidadosa, conselhos valiosos, incentivo, paciência, disponibilidade, confiança e apoio que sempre demonstrou. Gostaria de lhe agradecer por incentivar este meu trabalho de investigação, e por me permitir crescer tanto como investigador, mas também como pessoa.

À minha coorientadora Doutora Patrícia Pereira, pela oportunidade de trabalhar neste projeto, pelos valiosos conhecimentos científicos e experiências partilhados durante este último ano. Além disso, estou grato pela sua disponibilidade, dedicação, ajuda sempre que necessitei e principalmente por não me permitir que desistisse para além de todos os problemas. Agradeço também por me permitir crescer não só como investigador, mas também como pessoa.

Ao Doutor Augusto Pedro pelo apoio, disponibilidade e dedicação sempre que precisei ao longo deste percurso.

Às minhas colegas e amigas de laboratório, pela amizade, disponibilidade, compreensão, conselhos e apoio nos momentos mais difíceis que contribuíram para que este trabalho avançasse.

A todos os meus amigos que contribuíram ou auxiliaram na elaboração deste projeto, pela paciência, atenção e força que prestaram em momentos menos fáceis.

Agradeço a todas as pessoas envolvidas no Centro de Investigação em Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior (CICS-UBI).

Resumo

A demência é uma síndrome que está relacionada com a idade, apresenta várias causas e são raras as que se podem tratar ou prevenir eficazmente. A forma de demência mais frequente é a doença de Alzheimer, uma doença cerebral progressiva e degenerativa, irreversível e sem cura. A doença de Alzheimer é caracterizada por várias alterações morfológicas/patológicas, sendo as principais a acumulação extracelular de péptidos β -amilóides, denominados como placas $A\beta$, assim como a acumulação intracelular da proteína tau, a qual está associada a lesões intraneuronais e fibrilares que consistem em agregações de filamentos helicoidais emparelhados, compostos pela proteína tau hiperfosforilada, associada a microtúbulos, também conhecidos como emaranhados neurofibrilares. Diversas evidências mostram ainda que a acumulação de péptidos $A\beta$ leva também a um aumento da severidade da patologia tau. Como referido, atualmente a doença de Alzheimer, bem como outras doenças neurodegenerativas, não apresentam cura e as terapias existentes apenas diminuem temporariamente os sintomas. Desta forma uma abordagem promissora poderá ser a utilização de certos miARNs para o silenciamento da expressão de várias proteínas envolvidas no surgimento e progressão da doença de Alzheimer. Os miARNs representam a classe de ARNs não codificantes que atuam como potentes reguladores da pós-transcrição da expressão génica. Desta forma através dos microARNs consegue-se a inibição pós-transcricional da expressão das respetivas proteínas, causadoras do surgimento e progressão de várias doenças. Este trabalho teve como principal objetivo avaliar o efeito do pre-miR-9 e pre-miR-29, como agentes terapêuticos na DA, procurando a diminuição da expressão de proteínas alvo envolvidas na patologia, nomeadamente a APP, BACE1 e presenilina, na linha celular N2a695. Com a realização do projeto verificou-se que tanto o pre-miR-9, como o pre-miR-29b têm efeito nas proteínas da via amilóide em estudo. De forma geral foi observado um maior efeito pelo pre-miR-9 na APP e na presenilina e um maior efeito do pre-miR-29b na BACE1. No entanto foi ainda obtido um maior silenciamento da expressão da presenilina por parte do pre-miR-29b em estudos de *western blot* mas, por RT-qPCR e imunocitoquímica não se verificou uma diferença significativa entre a sinergia do pre-miR-9 e pre-miR-29b e o seu uso individual. Relativamente à BACE1 verificou-se um silenciamento superior após transfeção das células com o pre-miR-29b relativamente ao pre-miR-9 ou à co-transfeção com ambos os pre-miARNs. Em relação à APP verificou-se a inibição da sua expressão, induzida quer pelo pre-miR-9 quer pelo pre-miR-29b, isoladamente ou transferidos em simultâneo. Em suma, com o trabalho realizado foi possível verificar uma relação quer do pre-miR-9, quer do pre-miR-29b na regulação da expressão das proteínas estudadas (presenilina, BACE1 e APP). Num futuro próximo, pretende-se confirmar e aprofundar esta análise, especialmente nos casos que não foram previamente reportados. De uma forma mais específica, será interessante confirmar a ação regulatória do pre-miR-29b sobre a expressão da presenilina, assim como confirmar a possível relação destes pre-miRs com o silenciamento da expressão da APP, que não foram

ainda evidenciados na literatura. O conhecimento e melhor compreensão destas vias associadas ao silenciamento génico é de extrema importância, visto que estes pre-miRs poderão ser agentes terapêuticos com interesse de aplicação no tratamento da doença de Alzheimer.

Palavras-chave

Doença de Alzheimer, MicroARN-9, MicroARN-29, Mecanismo de silenciamento.

Abstract

Dementia is a syndrome which is related to the age, it has several causes and it is rare how can be effectively treated or prevented. The most common form of dementia is Alzheimer's disease, a progressive and degenerative brain disease, irreversible and without cure. Alzheimer's disease is characterized by several morphological/pathological changes, being the most relevant the extracellular accumulation of β -amyloid peptides, called AB plaques, as well as the intracellular accumulation of tau protein, which is associated with intraneuronal and fibrillary lesions consisting of paired helical filaments composed of the hyperphosphorylated protein, associated with microtubules, also known as neurofibrillary. Several evidences also show that the β -amyloid accumulation can also lead to an increased tau pathology severity. As noted, currently Alzheimer's disease as well as the other neurodegenerative diseases do not present an effective treatment and the therapies may only decrease the symptoms. In this way a promising approach can be the use of certain miRNAs for the silencing of several proteins involved in the onset and progression of Alzheimer's disease. The miRNAs represent a class of non-coding RNAs that act as post-transcriptional regulators of gene expression. Thus, through the use of microRNAs, it is possible to inhibit the expression of target proteins, involved on the onset and progression of various diseases. This work had as main objective to evaluate the effect of pre-miR-9 and pre-miR-29 as therapeutic agents in AD, looking for the inhibition of particular proteins currently associated to the disease, namely the APP, BACE1 and presenilin, in the N2a695 cell line. With this project it was concluded that both pre-miR-9 and pre-miR-29b have an effect on the proteins of the amyloid pathway. In general, there was a greater effect of pre-miR-9 on APP and presenilin expression and a greater effect of pre-miR-29b on BACE1. However, it was also observed the inhibition of presenilin by pre-miR-29b in western blot studies, but by RT-qPCR and immunocytochemistry there was no significant difference between the synergy of pre-miR-9 and pre-miR-29b and its individual use. Relative to BACE1 there was superior silencing after cell's transfection with pre-miR-29b relative to pre-miR-9 or co-transfection with both pre-miRNAs. Regarding APP, the inhibition of its expression was induced either by pre-miR-9 or pre-miR-29b, when isolated, or transferred simultaneously. In conclusion, the pre-miR-9 and pre-miR-29b in the regulation of the expression of the proteins studied (presenilin, BACE1 and APP) could be verified. In the near future, it is intended to confirm and deepen this analysis, especially in the cases which have not previously been reported. More specifically, it will be interesting to confirm the regulatory action of pre-miR-29b on the expression of presenilin, as well as confirm the possible relationship of these pre-miRs with the silencing of APP, which have not yet been evidenced in the literature. The knowledge and better understanding of these pathways associated with gene silencing assumes an extreme importance, since these pre-miRs may be therapeutic agents of interest for the treatment of Alzheimer's disease.

Keywords

Alzheimer's disease, MicroRNA-9, MicroRNA-29, Silencing mechanism.

Índice

1.	Introdução	1
1.1.	Demência.....	2
1.2.	Doença de Alzheimer: a sua epidemiologia	2
1.3.	Sintomas da doença de Alzheimer	4
1.4.	Fatores de risco	6
1.4.1.	Idade	7
1.4.2.	Histórico familiar	7
1.5.	Fatores de risco modificáveis.....	7
1.5.1.	Base genética da doença de Alzheimer.....	8
1.6.	Etiologia da doença de Alzheimer	10
1.6.1.	Patologia Amilóide	12
1.6.1.1.	Via não amiloidogénica	14
1.6.1.2.	Via amiloidogénica	14
1.6.1.2.1.	Proteína Precursora Amilóide	15
1.6.1.2.2.	β -secretase	18
1.6.1.2.3.	γ -Secretase	19
1.6.1.2.3.1.	Presenilina 1.....	20
1.6.1.2.4.	Péptido β -Amilóide.....	21
1.7.	Patologia Tau.....	23
1.8.	Tratamento	24
1.9.	ARN interferência.....	25
1.9.1.	Aplicações do microARN.....	26
1.9.2.	Caraterização do miARN.....	27
1.9.3.	Biogénese do miARN	27
1.9.4.	Desafios de uma aplicação terapêutica eficaz baseada em miARN.....	30
1.9.5.	miARNs envolvidos na doença de Alzheimer	32
1.9.5.1.	miR-9	34
1.9.5.2.	miR-29	35
2.	Objetivo	37
3.	Materiais e Métodos	39
3.1.	Materiais	40
3.2.	Métodos.....	41
3.2.1.	Condições de crescimento da bactéria <i>Escherichia coli</i> DH5 α	41
3.2.2.	Extração de ADN plasmídico de células <i>Escherichia coli</i> DH5 α	43
3.2.3.	Eletroforese em gel de agarose	43
3.2.4.	PCR convencional.....	44
3.2.5.	Purificação dos produtos de PCR.....	45

3.2.6.	Transcrição <i>in vitro</i>	45
3.2.7.	Cultura de células eucariotas	46
3.2.8.	Transfeção das células N2a695 com os pre-miARNs para extração de ARN	46
3.2.9.	Extração de ARN Total de células eucariotas.....	47
3.2.10.	Quantificação do ARN Total	49
3.2.11.	Síntese de ADN complementar	49
3.2.12.	PCR quantitativo em tempo real.....	49
3.2.13.	Transfeção das células N2a695 com os pre-miARNs para imunocitoquímica.....	50
3.2.14.	Imunocitoquímica.....	51
3.2.15.	Transfeção das células N2a695 com os pre-miARNs para extração proteica.....	52
3.2.16.	Extração proteica.....	54
3.2.17.	Quantificação de proteínas	54
3.2.18.	<i>Western Blotting</i>	54
3.2.18.1.	<i>SDS-PAGE</i>	54
3.2.18.2.	Eletrotransferência.....	55
3.2.18.3.	Imunodeteção de proteínas.....	56
3.2.19.	Análise estatística	56
4.	Resultados e discussão	57
4.1.	Purificação de plasmídeos que codificam pre-miR-9 e pre-miR-29b	58
4.2.	Amplificação génica por PCR convencional do pre-miR-29b	59
4.3.	Amplificação génica por PCR convencional do pre-miR-9	62
4.4.	Otimização da transcrição <i>in vitro</i>	63
4.5.	Análise da Expressão Proteica por <i>Western Blot</i>	64
4.6.	Imunocitoquímica.....	67
4.7.	Análise da Expressão Génica por RT-qPCR	71
5.	Conclusão e Perspetivas Futuras	75
6.	Referências Bibliográficas.....	78

Lista de Figuras

Figura 1 - Alterações percentuais em causas de morte selecionadas (todas as idades) entre 2000 e 2014.

Figura 2 - Demonstração da formação de placas β -amilóides e de emaranhados neurofibrilares.

Figura 3 - Influência da via amilóide na patologia tau.

Figura 4 - Metabolismo da APP.

Figura 5 - Consequências da formação e agregação de péptidos AB em placas.

Figura 6 - Processamento da APP nos neurónios.

Figura 7 - Representação dos locais de clivagem da APP.

Figura 8 - Arquitetura e a estrutura da γ -secretase humana.

Figura 9 - Componentes da γ -secretase, com ênfase na presenilina.

Figura 10 - Hipótese da cascata amilóide.

Figura 11 - Etiologia da DA com alvos terapêuticos.

Figura 12 - Diferentes usos de miARN para diferentes doenças, usado tanto para diagnóstico como para terapêutica.

Figura 13 - Representação esquemática da biogénese de miARN e o seu envolvimento em abordagens terapêuticas.

Figura 14 - Representação esquemática do silenciamento do ARNm alvo.

Figura 15 - Principais barreiras encontradas na entrega *in vivo* de microARNs e mecanismos de transporte através da barreira hematoencefálica.

Figura 16 - Desenho experimental das condições de crescimento da bactéria *Escherichia coli* DH5 α .

Figura 17 - Desenho experimental da transfeção das células N2a695 com o pre-miR-9 e pre-miR-29b individualmente e em simultâneo numa placa de 12 poços.

Figura 18 - Desenho experimental da extração de ARN Total de células eucariotas numa placa de 12 poços.

Figura 19 - Desenho experimental da transfeção das células N2a695 com o pre-miR-9 e pre-miR-29b individualmente e em simultâneo numa placa de 24 poços.

Figura 20 - Desenho experimental da transfeção das células N2a695 com o pre-miR-9 e pre-miR-29b individualmente e em simultâneo numa placa de 6 poços.

Figura 21 - Purificação de extratos de ADN plasmidico de pre-miR-9 e pre-miR-29b.

Figura 22 - Otimização das condições de PCR para pre-miR-9 e pre-miR-29b.

Figura 23 - Eletroforese em gel de agarose a 1% para verificar a optimização da temperatura de *annealing* para amplificação do pre-miR-9.

Figura 24 - Eletroforese em gel de agarose a 1% para verificar a optimização da temperatura, tempo e quantidade de DNase a usar na transcrição *in vitro*.

Figura 25 - *Western blot* de extratos de proteína total da linha celular N2a695 para estudo do silenciamento da expressão da proteína BACE1 e PS1, após transfeção com o pre-miR-9 e pre-miR-29b individualmente ou em combinação (pre-miR-9 e pre-miR-29b em simultâneo).

Figura 26 - Níveis de expressão obtidos por *western blot* da linha celular N2a695 para estudo do silenciamento da expressão da presenilina, após transfeção com o pre-miR-9 e o pre-miR-29b individualmente e pre-miR-9 e pre-miR-29b em simultâneo.

Figura 27 - Imagens representativas de imunocitoquímica por microscopia confocal da linha celular N2a695 para estudo do silenciamento da expressão da presenilina, após transfeção com o pre-miR-9 e o pre-miR-29b individualmente e pre-miR-9 e pre-miR-29b em simultâneo.

Figura 28 - Níveis de expressão obtidos por imunocitoquímica da linha celular N2a695 para estudo do silenciamento da expressão da presenilina, após transfeção com o pre-miR-9 e o pre-miR-29b individualmente e pre-miR-9 e pre-miR-29b em simultâneo.

Figura 29 - Imagens representativas de imunocitoquímica por microscopia confocal da linha celular N2a695 para estudo do silenciamento da expressão da BACE1, após transfeção com o pre-miR-9 e o pre-miR-29b individualmente e pre-miR-9 e pre-miR-29b em simultâneo.

Figura 30 - Níveis de expressão obtidos por imunocitoquímica da linha celular N2a695 para estudo do silenciamento da expressão da BACE1, após transfeção com o pre-miR-9 e o pre-miR-29b individualmente e pre-miR-9 e pre-miR-29b em simultâneo.

Figura 31 - Níveis de expressão obtidos por RT-qPCR para avaliar o silenciamento da expressão do ARNm da presenilina na linha celular N2a695, após transfeção com o pre-miR-9 e pre-miR-29b individualmente e pre-miR-9 e pre-miR-29b em simultâneo.

Figura 32 - Níveis de expressão obtidos por RT-qPCR para avaliar o silenciamento da expressão do ARNm da APP na linha celular N2a695, após transfeção com o pre-miR-9 e pre-miR-29b individualmente e pre-miR-9 e pre-miR-29b em simultâneo.

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Estimativas da prevalência de demência em todo o mundo de acordo com o estudo de consenso de Delphi em 2005.

Tabela 2 - Sintomas nos diferentes estadios da DA.

Tabela 3 - Genes de risco associados à doença de Alzheimer.

Tabela 4 - Identificação de microARNs associados à doença de Alzheimer, relacionando os miARNs com os seus genes/proteínas alvo.

Tabela 5 - Sequências do pre-miR-9 e pre-miR-29b (obtidos em www.mirbase.org) e *primers* usados para a amplificação.

Tabela 6 - *Primers* utilizados no RT-qPCR dos ADNc dos genes em estudo.

Tabela 7 - Anticorpos utilizados para as proteínas em estudo em imunocitoquímica.

Tabela 8 - Anticorpos utilizados para as proteínas em estudo em *western blot*.

Lista de Acrónimos

A ₂₆₀	Absorvância a 260 nm
A ₂₈₀	Absorvância a 280 nm
AB	Péptido β-amilóide
AB ₄₀	Isoforma do péptido β-amilóide com 40 aminoácidos
AB ₄₂	Isoforma do péptido β-amilóide com 42 aminoácidos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementar
ADNp	ADN plasmídico
Ago	Proteínas Argonautes
Ago2	Proteína Argonaute-2
AICD	Domínio intracelular da proteína precursora amilóide
ApoE	Apolipoproteína E
APP	Proteína precursora amilóide
ARN	Ácido ribonucleico
ARNi	ARN de interferência
ARNm	ARN mensageiro
ARNr	ARN ribossomal
BACE1	β-secretase
BBB	Barreira hematoencefálica
BSA	Albumina sérica bovina
C83	Fragmento C-terminal ancorado na membrana clivado pela α-secretase
C99	Fragmento C-terminal ancorado na membrana clivado pela β-secretase
CDK5	<i>Cyclin dependent kinase 5</i> - Cinase dependente da ciclina 5
CG	Complexo de Golgi
CLU	Clusterina
CS	Quitossano
DA	Doença de Alzheimer
DEPC	Dietilpirocarbonato
DGCR8	Região crítica da síndrome de DiGeorge 8
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNases I	Desoxiribonuclease I
DNs	Doenças neurodegenerativas
dNTP's	Desoxirribonucleotídeos trifosfato
DO	Densidade óptica
dsARN	ARN de cadeia dupla
DYRK1A	Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

EDTA	Ácido etilenodiamino-tetracético
EGTA	Ácido etileno glicol-tetracético
EOAD	Início precoce da doença de Alzheimer
Exp5	Exportina-5
FAD	Doença de Alzheimer familiar
FBS	Soro fetal bovino
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fw	<i>Forward</i>
GSK-3	<i>Glycogen synthase kinase 3 - Glicogénio cinase sintase 3</i>
ICliPs	Proteases de clivagem intramembranar
LOAD	Início tardio da doença de Alzheimer
LRP	<i>Low-density lipoprotein receptor - Receptor de lipoproteínas de baixa densidade</i>
MARK	<i>MAP/microtubule affinity-regulating kinase</i>
miARN ou miR	microARN
miARN-miARN* duplex	MiARNs maduros de cadeia dupla
miRISC	Complexo de silenciamento de miARN
N2a	Linha celular de neuroblastoma de ratinho
N2a695	Linha celular de neuroblastoma de ratinho que codifica a proteína humana APP ₆₉₅
NCT	Nicastrina
NFH	Neurofilamento de cadeia pesada
NFT	Emaranhados neurofibrilares
OMS	Organização Mundial de Saúde
p3	Péptido N-terminal extracelular gerado pela clivagem da APP
PACT	Proteína cinase ativadora de ARN
pARNi	<i>Piwi-interacting ARN</i>
pb	Pares de base
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PBS-T	<i>Phosphate Buffered Saline - Tween</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PHF	Filamentos helicoidais emparelhados
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
PS1	Presenilina-1
PS2	Presenilina-2
PSA	Persulfato de amónio
PSEN1	Gene da presenilina 1
PSEN2	Gene da presenilina 2
PP2A	<i>Protein phosphatase 2^a</i>

pre-miARN	MiARN precursor
<i>primers</i>	Oligonucleótidos iniciadores
pri-miARN	Transcrito primário de miARN
PVDF	<i>Polyvinilidene difluoride</i>
RE	Retículo Endoplasmático
RNases	Ribonucleases
rNTPs	Ribonucleotídeos trifosfato
rpm	Rotações por minuto
RT-qPCR	PCR quantitativo em tempo real
<i>Rv</i>	<i>Reverse</i>
SAD	Doença de Alzheimer esporádica
sAPP α	APP solúvel clivada pela α -secretase
sAPP β	APP solúvel clivada pela β -secretase
sARNi	<i>Small interfering ARN</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulphate</i>
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio
SIRT1	Sirtuína 1
SNC	Sistema nervoso central
SorL1	<i>Sortilin related receptor 1</i>
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TB	<i>Terrific Broth</i>
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i>
TBS-T	<i>Tris-Buffered Saline - Tween</i>
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
TGS	Tampão Tris-Glicina-SDS
T _m	Temperatura de <i>melting</i>
TMDs	Domínios transmembranares
TOMM40	<i>Translocase of outer mitochondrial membrane 40 homolog</i>
TRBP ou TARBP2	Proteína de ligação TAR ARN
TRIzol	TripleXtractor
USD	Dólares
3'-UTR	Região 3' não traduzida
UV	Ultravioleta
YENPTY	Domínio crucial de triagem de tirosina-ácido glutâmico-asparagina-prolina-treonina-tirosina

1. Introdução

1.1. Demência

Demência é um termo genérico, utilizado para designar um conjunto alargado de doenças, que estão associadas a padrões distintos de sintomas e alterações patológicas cerebrais, sendo as principais a doença de Alzheimer, demência vascular, demência com corpos de Lewy, demência frontotemporal, doença de Parkinson e doença de Creutzfeldt-Jakob (Shaik *et al.*, 2018; Gaugler *et al.*, 2017; Briggs *et al.*, 2016). A demência é uma síndrome que está relacionada com a idade, apresenta várias causas e são raras as que se podem tratar ou prevenir eficazmente, afetando milhões de pessoas em todo o mundo. De uma forma geral, os sintomas mais característicos da demência são a deterioração do desempenho cognitivo, distúrbios comportamentais, perda de intelecto, dificuldades de resolução de problemas, e perda de outras habilidades cognitivas que afetam a capacidade da pessoa realizar atividades quotidianas conduzindo, por fim, à morte (Shaik *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2017; Gaugler *et al.*, 2017; Alagiakrishnan *et al.*, 2012). Estudos recentes demonstraram que muitas pessoas com sintomas de demência, especialmente pessoas com mais idade, têm alterações patológicas cerebrais associadas a mais que uma causa de demência (Gaugler *et al.*, 2017; O'Brien and Wong 2011). A demência que irá ser foco de estudo neste trabalho é a doença de Alzheimer.

1.2. Doença de Alzheimer: a sua epidemiologia

A doença de Alzheimer (DA) é a forma de demência mais frequente (Shaik *et al.*, 2018), sendo diagnosticada em 50 a 70% das pessoas com demência, em países ocidentais (Hong *et al.*, 2017). Esta doença foi descrita pela primeira vez em 1906, pelo médico alemão Alois Alzheimer, mas apenas na década de 1960, passou a ser reconhecida como a causa mais comum de demência na população idosa (Bali *et al.*, 2010; Tang and Gershon 2003). Atualmente é caracterizada como uma doença cerebral progressiva e degenerativa, irreversível e sem cura (Hong *et al.*, 2017; Barage and Sonawane 2015; Kumar *et al.*, 2015; Grimm *et al.*, 2013; Alagiakrishnan *et al.*, 2012). Por todas estas razões, a DA representa um grande problema de saúde a nível mundial e é uma das principais causas de mortalidade em indivíduos com idades mais avançadas (Shaik *et al.*, 2018; Gaugler *et al.*, 2017).

A doença de Alzheimer provoca um conjunto de alterações no cérebro que precedem o aparecimento da demência. Deste modo, podemos inferir que a DA não inclui apenas sintomas de demência, mas também todos os sintomas que causam um comprometimento leve do desempenho cognitivo. Assim, a expressão "doença de Alzheimer" é usada para todos os estadios da doença. Já o termo "demência de Alzheimer" é usado em indivíduos com DA, num estadio de demência. Portanto, "demência de Alzheimer" pode ser considerada um estadio da "doença de Alzheimer" (Gaugler *et al.*, 2017).

Estima-se que o número de pessoas que serão afetadas por esta doença aumente drasticamente nos próximos anos, sobretudo em países mais desenvolvidos, e que aproximadamente 5% da população idosa, com idade igual ou superior a 65 anos, sofra de DA ou outra demência, devido ao aumento da esperança média de vida (Shaik *et al.*, 2018; Batistela *et al.*, 2017; Gaugler *et al.*, 2017; Alagiakrishnan *et al.*, 2012; Pákáski and Kálmán 2008). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou que cerca de 11,2% da população mundial com mais de 60 anos de idade sofre de demência, mais do que de AVC, doença cardiovascular ou cancro (Gaugler *et al.*, 2017; Ballard *et al.*, 2011). Pela análise do gráfico da figura 1 pode depreender-se que a DA, ao contrário de outras doenças, tais como cancro da mama, cancro da próstata, infeção por HIV, entre outras, tem vindo a causar um elevado número de mortes (89%), talvez devido ao facto de ainda não existir uma cura eficaz (Gaugler *et al.*, 2017).

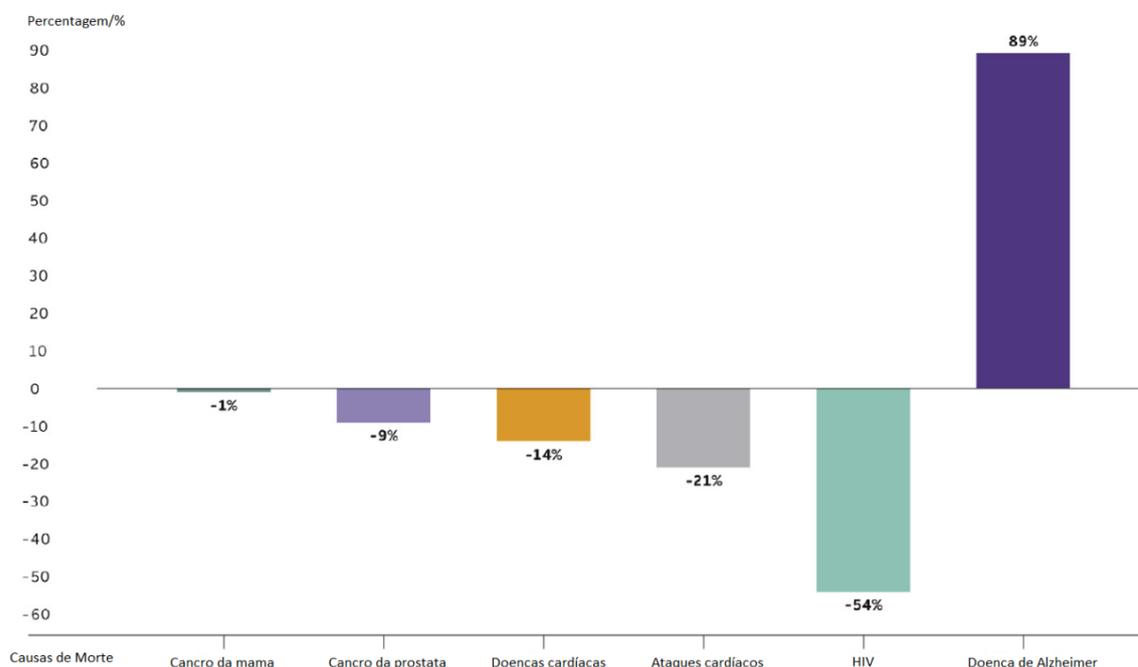


Figura 1. Alterações percentuais em causas de morte selecionadas (todas as idades) entre 2000 e 2014 (Adaptado de Gaugler *et al.*, 2017).

Uma vez que o número de doentes com DA tem vindo a aumentar, poderá inferir-se que o número de mortes devido à DA tenderá também a aumentar (Gaugler *et al.*, 2017). Em 2005, a *Alzheimer's Disease International* convocou um painel internacional de especialistas em demência para realizar o consenso de Delphi baseado em evidências sobre a prevalência de demência em todo o mundo (Tabela 1) (Ballard *et al.*, 2011).

Tabela 1. Estimativas da prevalência de demência em todo o mundo de acordo com o estudo de consenso de Delphi em 2005 (Adaptado de Ballard *et al.*, 2011).

	Prevalência de demência em pessoas com mais de 60 anos (%)	Número de pessoas com mais de 60 anos com demência (milhões)		
		2000	2020	2040
Europa Ocidental	5,4	4,9	6,9	9,9
Europa Oriental com baixa mortalidade adulta	3,8	1	1,6	2,8
Europa Oriental com elevada mortalidade adulta	3,9	1,8	2,3	3,2
América do Norte	6,4	3,4	5,1	9,2
América Latina	4,6	1,8	4,1	9,1
Norte de África e crescente do médio Oriente	3,6	1	1,9	4,7
Pacífico ocidental desenvolvido	4,3	1,5	2,9	4,3
China e Pacífico ocidental desenvolvido	4	6	11,7	26,1
Indonésia, Tailândia, Sri Lanka	2,7	0,6	1,3	2,7
Índia e sul da Ásia	1,9	1,8	3,6	7,5
África	1,6	0,5	0,9	1,6
Total	3,9	24,3	42,3	81,1

O estudo de Delphi estimou que haveria aproximadamente 24 milhões de pessoas com demência no mundo e previa que esse número iria aumentar para 42 milhões em 2020, 81 milhões em 2040 (Ballard *et al.*, 2011; Bali *et al.*, 2010) e 131 milhões até 2050 (Shaik *et al.*, 2018). Atualmente, devido ao elevado número de indivíduos afetados com demência, especialmente com a DA, existem enormes custos associados, estimados em 818 bilhões de dólares (USD) (Shaik *et al.*, 2018; Reddy *et al.*, 2017). Com a previsão de que o número de casos aumente nos próximos anos, prevê-se também que os custos associados a esta doença venham a ultrapassar os 2 trilhões de USD até 2030 (Shaik *et al.*, 2018).

1.3. Sintomas da doença de Alzheimer

De uma maneira geral, a DA pode ser definida como um distúrbio que está relacionado com o envelhecimento e que se caracteriza pelo declínio do desempenho cognitivo e perda de intelecto (Hong *et al.*, 2017; Barage and Sonawane 2015; Kumar *et al.*, 2015; Che *et al.*, 2014; Bali *et al.*, 2010). Alguns estudos sugerem que as alterações cerebrais associadas à DA podem começar 20 ou mais anos antes dos primeiros sintomas (Gaugler *et al.*, 2017), uma vez que a maioria dos doentes não apresenta sintomas durante os primeiros anos (3,3 anos) antes do início da demência, momento em que o comprometimento da memória pode ter atingido o seu limiar (Chen *et al.*, 2017). De uma maneira geral, os sintomas que caracterizam a DA podem envolver disfunções cognitivas ou não-cognitivas. Os principais domínios cognitivos que podem ser afetados são: a capacidade de organização, planeamento, decisão e julgamento (funções executivas); a capacidade de reter e evocar informação especialmente de

acontecimentos recentes (perdas de memória persistentes e frequentes); a capacidade de reconhecer pessoas e objetos; a capacidade de orientação no espaço e de produzir sequências de atos motores; a capacidade de realizar atividades de rotina e, por fim, a capacidade de expressão e compreensão verbal (dificuldades na linguagem). Enquanto, que no caso das disfunções não-cognitivas, o indivíduo apresenta sintomas psiquiátricos, distúrbios comportamentais, depressão, alucinações, ilusão e agitação (Gaugler *et al.*, 2017; Barage and Sonawane 2015; Bali *et al.*, 2010).

Dependendo das regiões cerebrais afetadas e da relevância que cada uma destas regiões assume para cada função cognitiva, os sintomas variam e a doença progride a um ritmo diferente (leve, moderado e severo) (Tabela 2). Por exemplo, nas fases iniciais da doença, os sintomas podem ser muito subtis, e os indivíduos apresentam um declínio cognitivo ligeiro (Gaugler *et al.*, 2017; Ballard *et al.*, 2011; Bali *et al.*, 2010). O sintoma inicial mais comum é a diminuição gradual da capacidade para se lembrar de memórias a curto prazo (lapsos de memória) e dificuldade em encontrar as palavras certas para objetos do quotidiano. Isto ocorre porque os primeiros neurónios a serem danificados estão geralmente em regiões cerebrais envolvidas na formação de novas memórias, o hipocampo (Gaugler *et al.*, 2017; Bali *et al.*, 2010). À medida que a doença progride, o dano neuronal é mais significativo noutras regiões do cérebro, os indivíduos exibem um declínio cognitivo evidenciado e as habilidades cognitivas e funcionais diminuem, incluindo a capacidade da pessoa para desempenhar funções corporais básicas, como andar e engolir. Os indivíduos vivenciam outras dificuldades, incluindo sintomas neurocomportamentais, como agitação, insónia e delírios (Batistela *et al.*, 2017; Gaugler *et al.*, 2017; Ribeiro *et al.*, 2013; Ballard *et al.*, 2011). Estes sintomas agravam-se à medida que as células cerebrais vão morrendo e a comunicação entre estas fica comprometida.

Nos estadios finais da doença, o declínio do desempenho cognitivo aumenta de tal forma, que os indivíduos necessitam de ajuda constante para as atividades básicas diárias, tais como tomar banho, vestir, comer e usar a casa de banho. Nesta fase da doença, os indivíduos perdem também a capacidade de comunicação e ficam confinados à cama e totalmente dependentes de cuidados ininterruptos (Batistela *et al.*, 2017; Gaugler *et al.*, 2017; Ribeiro *et al.*, 2013; Ballard *et al.*, 2011; Bali *et al.*, 2010). Quando a DA afeta as áreas do cérebro que controlam a deglutição e o movimento, o indivíduo torna-se vulnerável à morte por desnutrição, desidratação e pneumonia (Gaugler *et al.*, 2017; Ballard *et al.*, 2011).

Tabela 2. Sintomas nos diferentes estadios da DA (Adaptado de Gaugler *et al.*, 2017 e Bali *et al.*, 2010).

Estadios da DA	Sintomas
Inicial/leve*	<ul style="list-style-type: none"> • Perda de memória. • Dificuldades em reter e recuperar informações adquiridas recentemente. • Desafios no planeamento ou resolução de problemas.
	<ul style="list-style-type: none"> • Comprometimento progressivo da memória. • Retirada de trabalho ou atividades sociais. • Mudanças no humor e na personalidade. • Função cognitiva desorganizada. • Comportamento alterado. • Discreto ou menor julgamento. • Declínio progressivo no uso de linguagem. • Novos problemas com algumas palavras na fala ou escrita. • Confusão com tempo ou lugar. • Problemas na compreensão de imagens visuais e relacionamentos espaciais.
	<ul style="list-style-type: none"> • Necessidade de ajuda constante, mesmo para as atividades básicas diárias.

*Muitas vezes confundido com o normal declínio cognitivo relacionado com a idade.

1.4. Fatores de risco

Como mencionado anteriormente, a DA pode estar associada a diversas causas. Os maiores fatores de risco para o desenvolvimento da DA de início tardio são a idade avançada e o historial familiar. Para além destes, existem outros fatores de risco modificáveis, como a base genética da DA, que irão ser abordados mais à frente (Idda *et al.*, 2018; Shaik *et al.*, 2018; Gaugler *et al.*, 2017; Alagiakrishnan *et al.*, 2012). Assim, de uma forma geral, acredita-se que DA é causada por fatores ambientais e variações genéticas (Shaik *et al.*, 2018; Gaugler *et al.*, 2017; Masters *et al.*, 2015; Tang and Gershon 2003).

1.4.1. Idade

Dos 3 maiores fatores de risco, a idade é o mais significativo, uma vez que a grande maioria dos indivíduos com DA tem 65 ou mais anos de idade. A percentagem de pessoas com DA aumenta dramaticamente com a idade, sendo de 3% com idade entre 65-74 anos, 17% com idade entre 75-84 anos e 32% com idade igual ou superior a 85. Contudo, é importante salientar que a DA não faz parte do processo de envelhecimento natural e a idade avançada não é suficiente para causar o aparecimento da DA (Gaugler *et al.*, 2017; Ribeiro *et al.*, 2013; Alagiakrishnan *et al.*, 2012).

1.4.2. Histórico familiar

O histórico familiar não é necessariamente um fator crucial para que um indivíduo desenvolva a doença. No entanto, indivíduos que têm um progenitor ou algum irmão com DA estão mais propensos a desenvolver a doença do que aqueles que não possuem familiares de primeiro grau com DA. Por conseguinte, aqueles que têm mais do que um familiar de primeiro grau com DA têm um risco ainda maior de desenvolver esta doença neurodegenerativa. Quando certas doenças ocorrem entre indivíduos da mesma família, a hereditariedade (genética), fatores ambientais compartilhados e estilo de vida (alimentação e atividade física), ou ambos, podem desempenhar um papel importante no aumento ou diminuição do risco de desenvolver essa doença, e neste caso a DA (Gaugler *et al.*, 2017; Barage and Sonawane 2015; Alagiakrishnan *et al.*, 2012; Ballard *et al.*, 2011; Bali *et al.*, 2010).

1.5. Fatores de risco modificáveis

Embora alguns fatores de risco, como a idade e o histórico familiar não possam ser alterados, outros podem ser modificados (Gaugler *et al.*, 2017). Atualmente, para reduzir o risco de declínio do desempenho cognitivo, demência e, conseqüentemente a DA, é estritamente necessário promover mudanças no estilo de vida, para além de melhorar os tratamentos disponíveis, bem como a prevenção (Gaugler *et al.*, 2017; Ballard *et al.*, 2011). Existem evidências sólidas de que o estilo de vida influencia o risco de desenvolver DA. A falta de atividade física, a obesidade, a ingestão de bebidas alcoólicas e o tabagismo são os fatores de risco modificáveis mais importantes para a prevenção da DA (Gaugler *et al.*, 2017; Ballard *et al.*, 2011). Muitas condições médicas tratáveis como o acidente vascular cerebral, diabetes, hipertensão e hipercolesterolemia estão também associadas a um aumento do risco de desenvolver DA. Assim, acredita-se que promover um estilo de vida saudável possa retardar/reduzir o surgimento do declínio do desempenho cognitivo, o risco de demência e, conseqüentemente, o risco de desenvolver DA (Gaugler *et al.*, 2017; Ballard *et al.*, 2011).

1.5.1. Base genética da doença de Alzheimer

O risco de desenvolver DA atribuído a fatores genéticos está estimado em cerca de 70% dos casos (Ballard *et al.*, 2011). Diversos estudos estabeleceram que uma ampla gama de genes está associada ao aparecimento/desenvolvimento da DA, incluindo genes preditivos (mutacionais - genes causadores da DA) ou de susceptibilidade (fatores de risco). As mutações nos genes preditivos ligados à DA, levam a que os indivíduos, portadores desses genes, tenham uma maior probabilidade de desenvolver a doença (Masters *et al.*, 2015; Alagiakrishnan *et al.*, 2012). Contudo, para além dos fatores genéticos, os fatores ambientais também estão envolvidos no surgimento e na progressão da DA. Assim sendo, a doença de Alzheimer pode ser classificada como de início precoce (EOAD), geralmente de ocorrência familiar (FAD) ou de início tardio (LOAD), de ocorrência esporádica (SAD) (Shaik *et al.*, 2018; Barage and Sonawane 2015; Masters *et al.*, 2015; Alagiakrishnan *et al.*, 2012).

A EOAD ocorre em indivíduos com idades inferiores a 65 anos e representa apenas 5% dos casos. Desses 5%, uma pequena percentagem dos casos de Alzheimer de início precoce ($\leq 1\%$) desenvolve-se como resultado de mutações num dos 3 genes seguintes: o gene da proteína precursora amilóide (APP), no cromossoma 21; o gene da presenilina 1 (PSEN1), no cromossoma 14 ou da presenilina 2 (PSEN2), no cromossoma 1. De uma forma geral, as mutações nestes 3 genes levam a um aumento da produção dos péptidos β -amilóide (AB) (Reddy *et al.*, 2017; Barage and Sonawane 2015; Masters *et al.*, 2015; Grimm *et al.*, 2013; Alagiakrishnan *et al.*, 2012; Ballard *et al.*, 2011; O'Brien and Wong 2011). Os indivíduos com mutações em qualquer um desses três genes tendem a desenvolver os sintomas da DA antes dos 65 anos, enquanto a grande maioria dos indivíduos com DA tem doença de início tardio, onde os sintomas só se tornam evidentes com uma idade igual ou superior a 65 anos (Gaugler *et al.*, 2017; Masters *et al.*, 2015; O'Brien and Wong 2011). A mutação que é mais frequente ocorre no gene da PSEN1. A presenilina faz parte do complexo γ -secretase e está envolvida na clivagem da APP, originando a formação dos péptidos AB₄₂.

Por outro lado, a LOAD é a forma mais comum de DA, correspondendo a 95% dos casos, e onde estão envolvidos quer fatores genéticos, quer fatores ambientais. Os genes maioritariamente envolvidos são os que codificam a Apolipoproteína E (ApoE (no cromossoma 19)), glicogénio cinase sintase 3 Beta (GSK-3 β), *dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A* (DYRK1A), Tau, *translocase of outer mitochondrial membrane 40 homolog* (TOMM40) e clusterina (CLU) (Tabela 3) (Wilkins and Swerdlow 2017; Ballard *et al.*, 2011; Bali *et al.*, 2010). Um fator de risco genético proeminente para desenvolver LOAD é o alelo e4 da apolipoproteína E (Barage and Sonawane 2015; Alagiakrishnan *et al.*, 2012; Ballard *et al.*, 2011; Bali *et al.*, 2010), assim como *sortilin related receptor 1* (SorL1).

Tabela 3. Genes de risco associados à doença de Alzheimer (Adaptado de Ballard *et al.*, 2011).

Genes Familiares	Papel na doença de Alzheimer
APP	É uma proteína membranar que sofre sucessivas clivagens mediadas por secretases, levando ao processamento não amiloidogénico e/ou à produção de peptídeos AB. As mutações no gene da APP resultam preferencialmente no seu processamento pela via amiloidogénica.
PSEN1	É um componente do complexo γ -secretase, e está envolvida no processamento da APP em peptídeos AB. As mutações no gene PSEN1 levam ao aumento da produção do peptídeos AB ₄₂ , em detrimento da formação dos peptídeos AB ₄₀ .
PSEN2	Tal como na PSEN1, mutações no gene da PSEN2 podem levar ao aumento da produção dos peptídeos AB ₄₂ , e à formação das placas mais facilmente do que dos peptídeos AB ₄₀ .
SorL1	É um substrato da γ -secretase e, por isso, afeta o processamento da APP. SorL1 interage com a ApoE, levando à sua sobre-expressão, resultando numa redução da produção dos peptídeos AB. Indivíduos com DA têm concentrações reduzidas de SorL1.
Genes de risco	Papel na doença de Alzheimer
ApoE	É o principal transportador de colesterol no cérebro. O ApoE liga-se ao peptídeo AB de forma específica e está envolvido na sua remoção através da interação com a LRP
GSK-3B	Os produtos resultantes da clivagem da APP podem ativar GSK-3B, e desta ativação resulta o aumento da fosforilação da proteína tau, levando à formação de emaranhados neurofibrilares (NFTs). GSK-3B fosforila de forma mais eficaz a proteína tau se esta tiver sido anteriormente fosforilada por outras cinases, como a CDK5*.
DYRK1A	A atividade do DYRK1A é regulada positivamente pelos peptídeos AB, portanto, DYRK1A é um vínculo entre a via amilóide e a via da fosforilação da tau. DYRK1A está envolvido na fosforilação da proteína tau, estimulando a posterior fosforilação realizada pelo GSK-3B. Além disso, está também envolvido na fosforilação da APP, o que leva ao aumento do processamento amiloidogénico através da interação aumentada com a β -secretase.
Tau	A hiperfosforilação da proteína Tau leva à formação de NFTs. As mutações na Tau podem afetar o splicing e a eficácia da ligação aos microtúbulos.
TOMM40	Interage com a APP e está associado ao início tardio da DA.
CLU	Clusterina é uma chaperona envolvida na formação dos peptídeos AB e está associada à gravidade e progressão da DA.

#LRP - *low-density lipoprotein receptor* - recetor de lipoproteínas de baixa densidade.

*CDK5 - *cyclin dependent kinase 5* - cinase dependente da ciclina 5.

1.6. Etiologia da doença de Alzheimer

O cérebro de um indivíduo com DA apresenta inflamação, disfunção e morte neuronal, perda de volume cerebral e perdas sinápticas, resultando em danos seletivos em diversas regiões cerebrais responsáveis pela cognição e memória (Shaik et al., 2018; Gaugler et al., 2017; Hong et al., 2017; Li et al., 2017(a); Che et al., 2014). A DA é caracterizada por várias alterações morfológicas/patológicas, sendo as principais a acumulação extracelular de péptidos A β , denominados como placas A β , e a acumulação intracelular da proteína tau, a qual está associada a microtúbulos hiperfosforilados, também conhecidos como emaranhados neurofibrilares (NFT) (Shaik *et al.*, 2018; Dries *et al.*, 2017).

As placas amilóides são compostas por aglomerados de péptidos A β e estas são cingidas a neurónios e astrócitos distróficos. Os emaranhados neurofibrilares são lesões intraneuronais e fibrilares que consistem em agregados de filamentos helicoidais emparelhados (PHF), compostos pela proteína tau hiperfosforilada, associada a microtúbulos (Figura 2) (Shaik *et al.*, 2018; Dries *et al.*, 2017; Masters *et al.*, 2015; Tang and Gershon 2003).

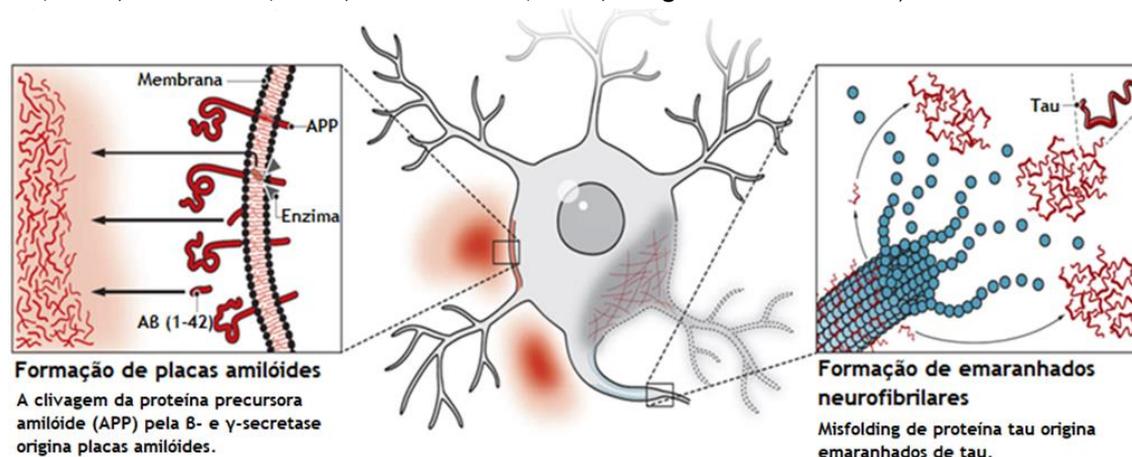


Figura 2. Demonstração da formação de placas β -amilóides e de emaranhados neurofibrilares. A formação de placas β -amilóides (lado esquerdo da figura) ocorre devido à clivagem da APP, resultando na formação de péptidos A β . A formação de emaranhados neurofibrilares, ocorre devido à hiperfosforilação da proteína tau, que perde afinidade para os microtúbulos, e assim, provoca a desintegração dos mesmos (lado direito) na DA (Adaptado de Pospich and Raunser 2017).

É importante salientar que a formação dos emaranhados neurofibrilares (patologia Tau) pode existir sem que tenha ocorrido anteriormente a formação e acumulação de péptidos A β , contudo, o contrário já não acontece. Isto sugere que a formação dos emaranhados neurofibrilares ocorre antes da patologia amilóide. No entanto, quando ocorre a patologia amilóide, esta provoca um agravamento da patologia Tau, pois a formação de péptidos A β , vai provocar a formação dos emaranhados neurofibrilares (Figura 3) (Ballard *et al.*, 2011; Bali *et al.*, 2010).

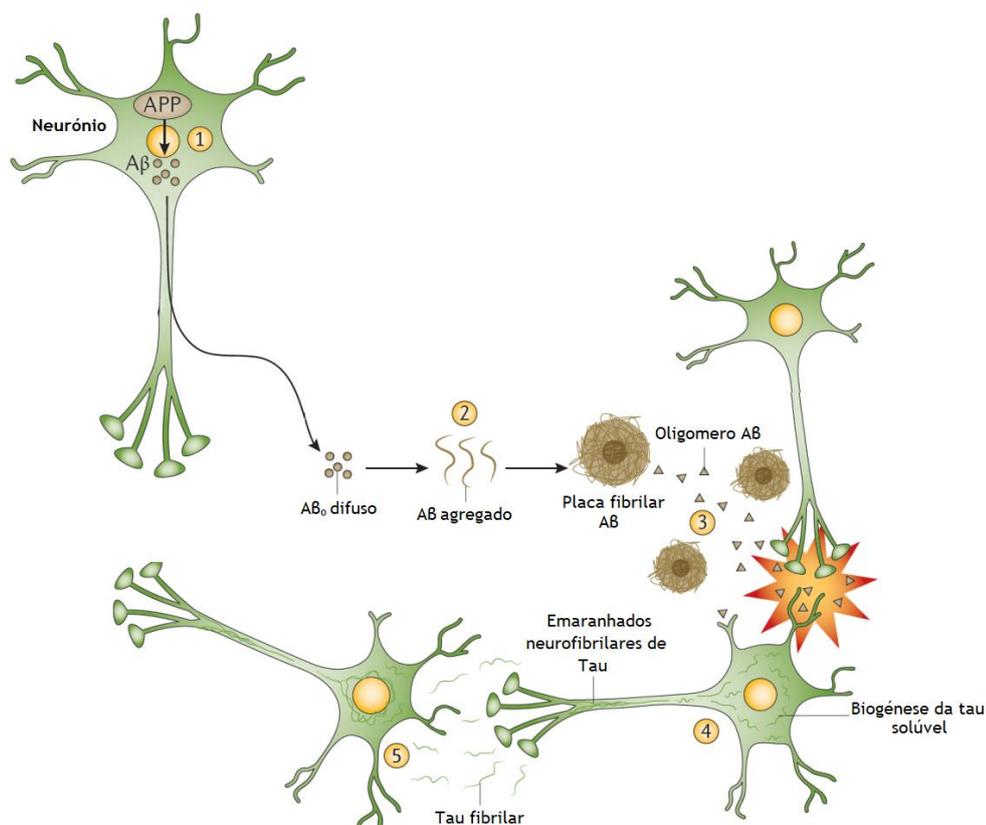


Figura 3. Influência da via amilóide na patologia tau. No passo 1, os péptidos Aβ originados a partir da clivagem da APP são libertados para o meio extracelular, como oligómeros difusíveis (Aβ_o). No passo 2, os peptídeos Aβ_o agregam-se no espaço intercelular para formar agregados fibrilares que, por sua vez, se aglomeram em placas. Relativamente ao passo 3, alguns oligómeros tóxicos, que se dissociam dos agregados fibrilares e placas Aβ, induzem a agregação da proteína Tau. No passo 4, a hiperfosforilação da proteína Tau ocorre nos neurónios, levando ao desenvolvimento dos emaranhados neurofibrilares. Por fim, no passo 5, os emaranhados neurofibrilares podem ser libertados e absorvidos por neurónios saudáveis, provocando danos nos neurónios adjacentes (Adaptado de Masters *et al.*, 2015 e Jucker and Walker 2013).

Tendo em conta o mencionado anteriormente, a hipótese da cascata amilóide sugere que a deposição de placas Aβ desencadeia a disfunção neuronal e sináptica e neurodegeneração, interferindo na comunicação sináptica entre neurónios (Gaugler *et al.*, 2017; Briggs *et al.*, 2016; Che *et al.*, 2014; Bali *et al.*, 2010), enquanto os emaranhados da proteína tau bloqueiam o transporte de nutrientes e outras moléculas essenciais aos neurónios (Hu *et al.*, 2018; Barage and Sonawane 2015; Ballard *et al.*, 2011). Assim, o dogma atual coloca o péptido Aβ como iniciador molecular do surgimento e progressão da DA. Com base em várias evidências científicas, isto ocorre devido a mutações na APP e nas proteínas presenilinas, principais componentes do complexo γ -secretase, que ao clivarem a APP produzem os péptidos Aβ (Chu and Praticò 2016; Nalivaeva and Turner 2016; Pernecky *et al.*, 2014).

1.6.1. Patologia Amilóide

O péptido A β forma o conteúdo das placas amilóides (placas A β). As placas A β são depósitos amilóides tóxicos encontrados dentro das células neuronais ou no meio extracelular, em diversas regiões do cérebro, mas de forma mais abundante no hipocampo e neocórtex do cérebro de indivíduos com DA (Masters *et al.*, 2015; Ballard *et al.*, 2011; O'Brien and Wong 2011; Bali *et al.*, 2010). Os péptidos A β , quer na sua conformação solúvel, quer quando estão associados em placa amilóide, estão relacionados com a neurodegeneração. Portanto, acredita-se que estudar como este péptido amilóide é formado, inibido ou eliminado, é essencial para a compreensão da DA e para o desenvolvimento de possíveis tratamentos para a mesma (Briggs *et al.*, 2016; Brinkmalm *et al.*, 2013; Grimm *et al.*, 2013; Ribeiro *et al.*, 2013; Ballard *et al.*, 2011; Bali *et al.*, 2010).

Como mencionado anteriormente, o péptido A β é gerado após duas clivagens enzimáticas sucessivas de uma proteína transmembranar, a APP. As primeiras enzimas que clivam a APP nos locais α ou β são denominadas por α - ou β -secretase, respetivamente. Estes dois locais estão próximos (cerca de 10 a 30 aminoácidos) do lado extracelular do domínio transmembranar da APP. As duas proteases (α - ou β -secretase) competem pela clivagem da APP originando dois produtos distintos, nomeadamente a APP solúvel (sAPP α se clivada por α -secretase ou sAPP β se clivada pela β -secretase), que é libertada para o espaço extracelular, e um C-terminal ancorado na membrana (C83 ou C99, quando clivado pela α - e β -secretase, respetivamente) (Figura 4) (Wilkins and Swerdlow 2017; Grimm *et al.*, 2013; Puig and Combs 2013; Vingtdoux *et al.*, 2012; Bali *et al.*, 2010).

Relativamente às funções fisiológicas dos fragmentos de APP solúveis, sabe-se que os fragmentos sAPP α melhoram a sinaptogénese, a proliferação de neurites, a neurogénese, e que podem ter um efeito protetor contra a toxicidade amilóide. Já os fragmentos sAPP β , comparados com o sAPP α , são 100 vezes menos neuroprotetores e têm efeitos opostos relativamente à proliferação de neurites (Dries *et al.*, 2017; Nalivaeva and Turner 2016; Barage and Sonawane 2015; Brinkmalm *et al.*, 2013; Puig and Combs 2013; Zhang *et al.*, 2011). Após a clivagem realizada pela α - ou β -secretase, ocorre ainda uma segunda clivagem, realizada por um complexo enzimático, denominado γ -secretase. Este complexo é composto por várias subunidades proteicas, onde a atividade catalítica é conferida por proteínas transmembranares denominadas de presenilina-1 (PS1) e presenilina-2 (PS2) (Chu and Praticò 2016; Duggan and McCarthy 2016; Grimm *et al.*, 2013; Vingtdoux *et al.*, 2012; Ballard *et al.*, 2011). Devido à atividade dessas duas secretases, o fragmento C-terminal, resultante da anterior clivagem da APP, é clivado numa mistura de péptidos A β com um tamanho que varia entre 37 a 49 aminoácidos (Audagnotto *et al.*, 2017; Cai *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2017(b); Barage and Sonawane 2015). Deste modo, devido à importância funcional das β - e γ -secretases, estas proteínas são vistas como alvos terapêuticos de interesse na DA (Wilkins and Swerdlow 2017; Ballard *et al.*, 2011; Bali *et al.*, 2010).

Podemos então referir que existem duas vias a partir da clivagem da APP, a não amiloidogénica e a amiloidogénica (Figura 4) (Wilkins and Swerdlow 2017; Barage and Sonawane 2015; Kumar *et al.*, 2015; Che *et al.*, 2014; Zolezzi *et al.*, 2014; Puig and Combs 2013; Ballard *et al.*, 2011; O'Brien and Wong 2011).

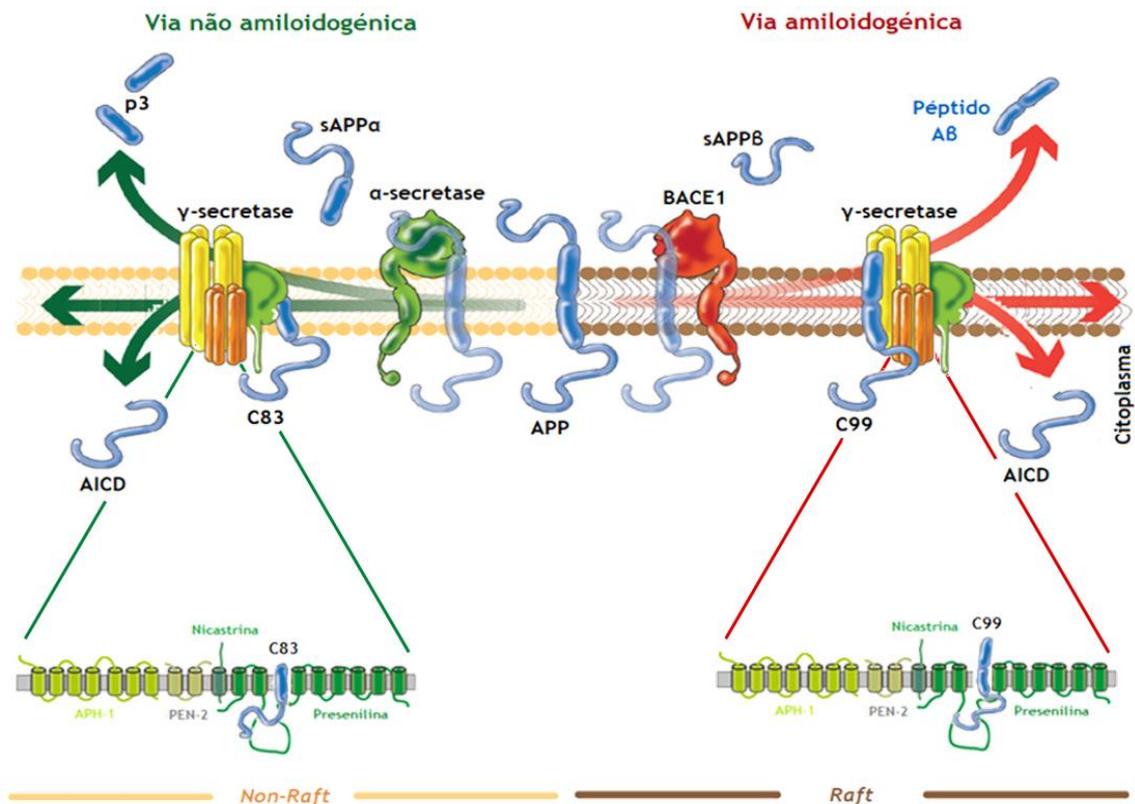


Figura 4. Metabolismo da APP. Na membrana celular, a APP pode ser submetida a um processamento não amiloidogénico ou amiloidogénico. A APP é clivada por α - ou β -secretase e, em seguida, pela γ -secretase. As clivagens realizadas pela α - e γ -secretase levam à produção do péptido p3 através da via não amiloidogénica. Relativamente às clivagens realizadas pela β - e γ -secretase, estas levam à produção do péptido AB através da via amiloidogénica. Os péptidos AB formam oligómeros e, eventualmente podem acumular-se em placas AB. Nesta figura pode-se também observar que o processamento amiloidogénico da APP localiza-se em rafts lipídicos ricos em colesterol. Assim o aumento do teor lipídico dentro das células neuronais pode levar ao processamento amiloidogénico da APP (Adaptado de Zolezzi *et al.*, 2014 e Grimm *et al.*, 2013).

1.6.1.1. Via não amiloidogénica

Numa situação normal, ou seja, num indivíduo saudável, a APP é clivada pela enzima α -secretase, formando-se sAPP α e C83. Seguidamente, o fragmento C83 é clivado pela γ -secretase, gerando um domínio intracelular da APP com 6 kDa (AICD) e um péptido N-terminal com cerca de 3 kDa (p3 (não tóxico)), no espaço extracelular. Esta via é designada como não amiloidogénica (Figura 4) (Idda *et al.*, 2018; Dries *et al.*, 2017; Wilkins and Swerdlow 2017; Duggan and McCarthy 2016; Barage and Sonawane 2015; Perneczky *et al.*, 2014).

1.6.1.2. Via amiloidogénica

Numa situação em que a enzima β -secretase apresenta uma expressão superior à expressão da α -secretase, ou seja, num indivíduo com DA, a β -secretase vai clivar a APP em dois fragmentos: sAPPB e um fragmento C-terminal ligado à membrana, C99. O sAPPB solúvel N-terminal é libertado para o meio extracelular e o C99, retido na membrana, é o precursor imediato do péptido AB (Duggan and McCarthy 2016; Kumar *et al.*, 2015; Ballard *et al.*, 2011; Willem *et al.*, 2009). Posteriormente, a C99 é clivada pela γ -secretase, gerando AICD e péptidos AB, no espaço extracelular. Após a clivagem da C99 pela γ -secretase formam-se maioritariamente péptidos AB₄₀ e AB₄₂. Na DA, a formação de péptidos AB₄₂ é favorecida, ou seja, o péptido AB₄₂ agrega-se mais facilmente do que o AB₄₀ e a proporção destas duas isoformas é influenciada pelo padrão de clivagem da APP, o qual varia dependendo da α -, β - e γ -secretases, levando assim à formação de oligómeros AB. Deste modo, os péptidos AB₄₂ estão intimamente ligados à DA devido à sua tendência para agregar e formar placas AB extracelulares na região cerebral (Cai *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2017(b)). Esta via é designada como amiloidogénica (Figura 4). A formação destes oligómeros tóxicos vai provocar neurotoxicidade, respostas inflamatórias, perda da função sináptica, ativação de astrócitos e microglia, danos cerebrovasculares e, ainda, a hiperfosforilação da proteína Tau (Figura 5) (Chu and Praticò 2016; Kumar *et al.*, 2015; Ballard *et al.*, 2011; Pákási and Kálmán 2008; Christensen 2007).

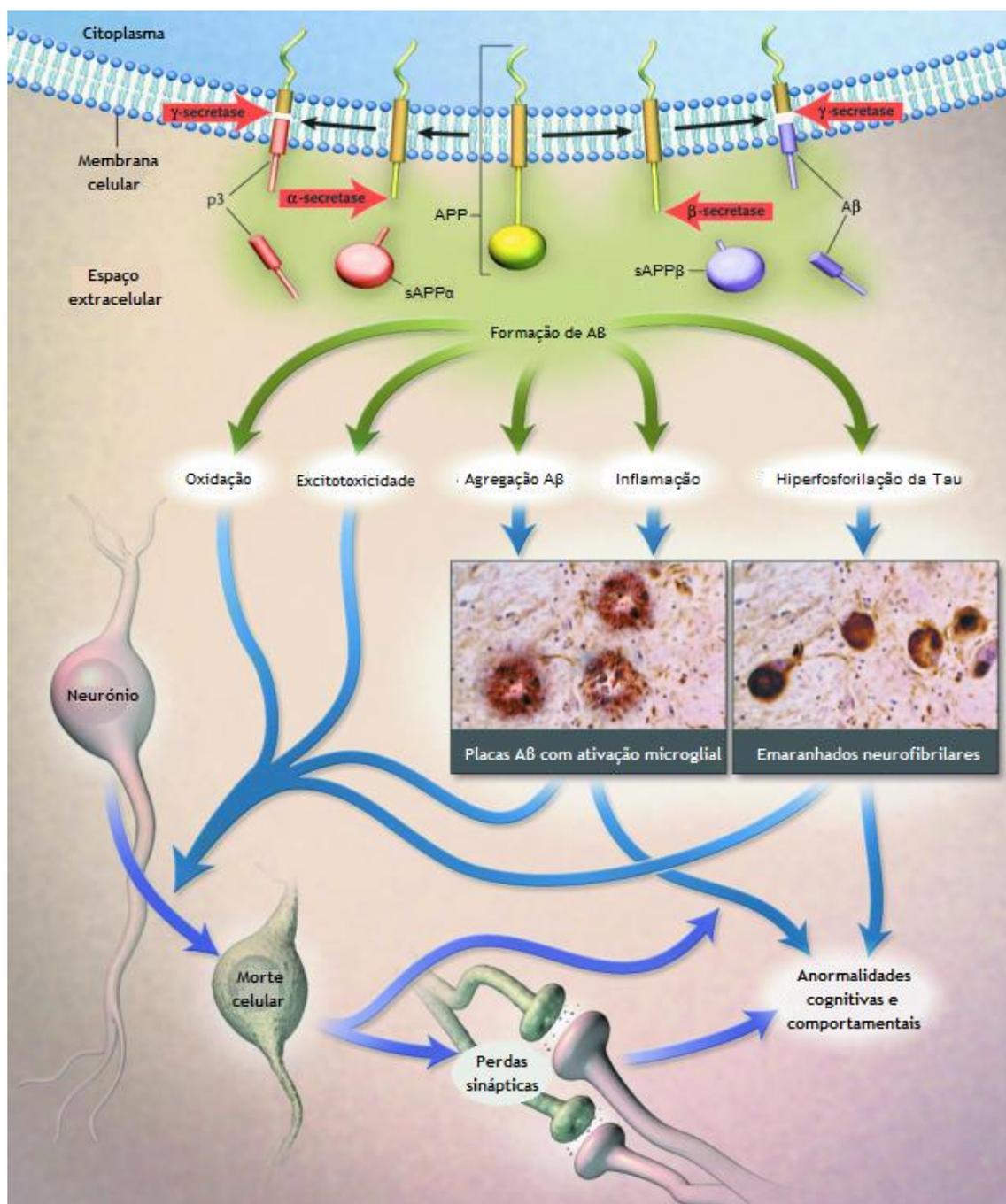


Figura 5. Consequências da formação e agregação de péptidos AB em placas. Representação das consequências da formação de placas AB, nomeadamente, respostas oxidativas e inflamatórias, perda da função sináptica, ativação de astrócitos e microglia, danos cerebrovasculares e, ainda, hiperfosforilação da proteína Tau (Adaptado de Christensen 2007).

1.6.1.2.1. Proteína Precursora Amilóide

A proteína precursora amilóide é uma glicoproteína transmembranar integral de tipo I, que apresenta dois locais de clivagem proteolítica, um localizado perto da membrana e outro dentro do domínio transmembranar (Shaik *et al.*, 2018; Wilkins and Swerdlow 2017; Barage and Sonawane 2015; Grimm *et al.*, 2013; Vingtdoux *et al.*, 2012; Bali *et al.*, 2010). Estima-se que apenas cerca de 0,5% de todos os casos de DA sejam causados por mutações da APP (Tang

and Gershon 2003). A expressão da APP ocorre de forma ubíqua e o péptido A β é um dos produtos catabólicos do metabolismo da APP.

A APP apresenta um grande domínio extracelular N-terminal e um curto domínio citoplasmático C-terminal. Esta proteína é sintetizada no retículo endoplasmático (RE) e sofre modificações pós-traducionais (incluindo glicosilações, fosforilações, entre outras) no complexo de Golgi (CG), sendo posteriormente transportada pelo transporte axonal para os terminais sinápticos através de uma via secretora (O'Brien and Wong 2011; Bali *et al.*, 2010). Os passos cruciais no processamento da APP ocorrem na superfície celular e na via trans-Golgi, especificamente no último conjunto de vesículas produzidas pelo CG que têm como destino a superfície da célula, o endossoma e o lisossoma. Do CG, a APP pode ser transportada para a superfície celular ou diretamente para um compartimento endossomal. Na superfície da célula, a APP pode sofrer proteólise diretamente pela α - e γ -secretase, ou ser reintegrada e revestida com clatrina noutro compartimento endossomal, contendo β - e γ -secretase. É esta última proteólise da APP que resulta na produção de péptidos A β , que são então secretados para o espaço extracelular (Figura 6) (O'Brien and Wong 2011).

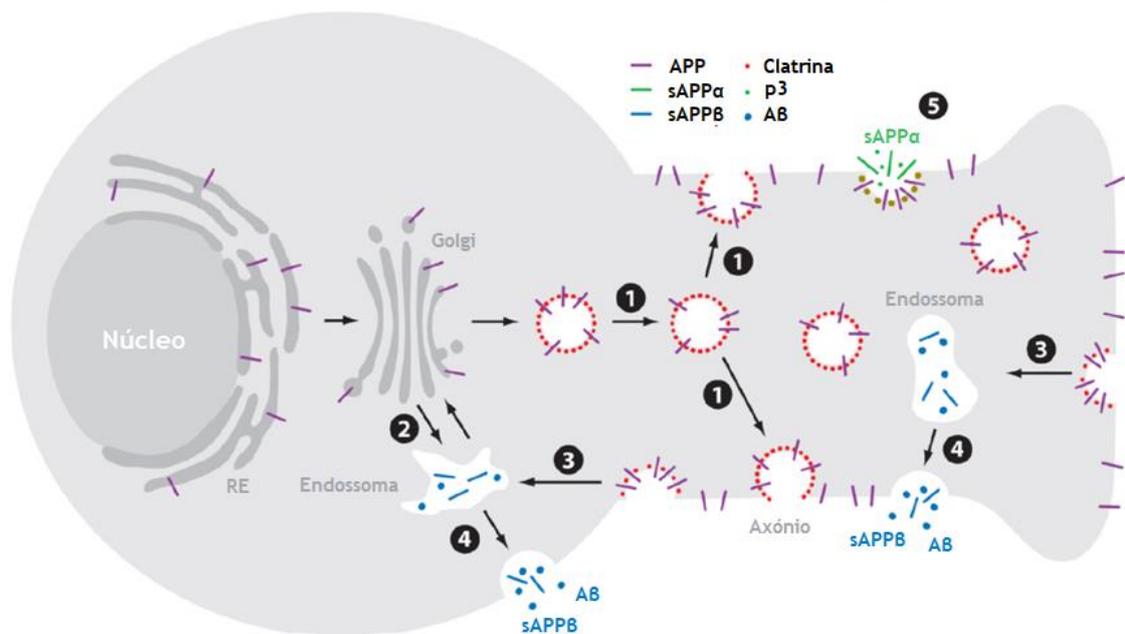


Figura 6. Processamento da APP nos neurónios. A APP (traço de cor roxa) é transportada do complexo de Golgi para a superfície celular do axónio (1) ou para o compartimento endossomal (2). Após a inserção na superfície celular, a APP é clivada pela α -secretase gerando o fragmento sAPP α (traço de cor verde) e p3 (ponto de cor verde) (5), embora outros sejam reintegrados em endossomas (3), onde o péptido A β é gerado (ponto com cor azul). Após a proteólise, o endossoma é excitado para o meio extracelular (4), libertando o péptido A β (ponto de cor azul) e o fragmento sAPPB (traço de cor azul). RE- Reticulo endoplasmático (Adaptado de O'Brien and Wong 2011).

O papel exato da APP ainda não é conhecido, porém sabe-se que esta proteína e os seus produtos proteolíticos estão envolvidos no transporte axonal e no controlo transcrricional desde a adesão celular à apoptose (O'Brien and Wong 2011; Bali *et al.*, 2010).

Como mencionado anteriormente, APP pode sofrer três tipos de clivagem realizados pela α -, β - e γ -secretases. A α -secretase cliva a APP nos seguintes resíduos: Lys₆₈₇ e Leu₆₈₈ para gerar péptidos AB com 16 a 17 aminoácidos (AB₁₆ e AB₁₇), enquanto a clivagem realizada pela β -secretase ocorre nos resíduos: Met₆₇₁ e Asp₆₇₂ para gerar os péptidos AB₄₀ e AB₄₂. AB₄₀ é o produto dominante da clivagem normal da APP e é encontrado num cérebro envelhecido saudável. Em contraste, a clivagem realizada pela γ -secretase divide Ile₇₁₂ e Thr₇₁₄ para gerar os péptidos AB₄₀ e AB₄₂, respetivamente, sendo que esta última forma é o principal componente das placas AB observadas no cérebro de um indivíduo com DA (Figura 7). Como os péptidos AB₄₂ são insolúveis e mais neurotóxicos do que os péptidos AB₄₀, atualmente, os péptidos AB₄₂ são considerados como tendo um papel central nos processos patológicos da DA (Brinkmalm *et al.*, 2013; Grimm *et al.*, 2013; O'Brien and Wong 2011; Bali *et al.*, 2010; Tang and Gershon 2003).

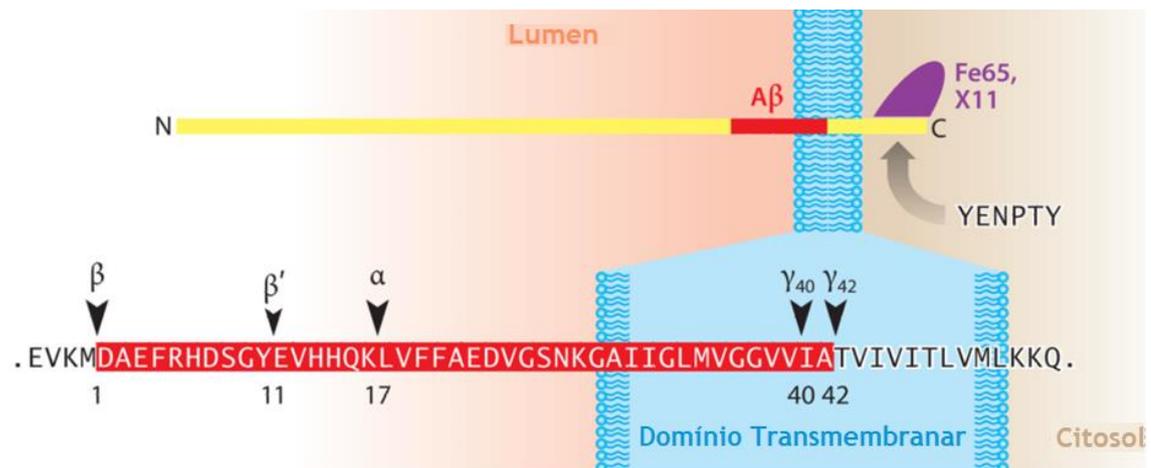


Figura 7. Representação dos locais de clivagem da APP. APP possui ectodomínios N-terminais, biologicamente ativos, assim como um C-terminal mais curto que contém um domínio crucial de triagem de tirosina-ácido glutâmico-asparagina-prolina-treonina-tirosina (YENPTY), onde se ligam X11 e Fe65, denominados de adaptadores de proteínas. O péptido A β começa dentro do ectodomínio e continua na região transmembranar (cor vermelha). Na figura observa-se também a clivagem da APP mostrando os locais de clivagem das secretases, tanto pela via amilo génica (realizada pela β -secretase) como pela via não amilo génica (realizada pela α -secretase), seguida da clivagem por parte da γ -secretase (Adaptado de O'Brien and Wong 2011).

1.6.1.2.2. β -secretase

A β -secretase, também conhecida como BACE1, é a enzima responsável pela clivagem da APP no local β (Shaik *et al.*, 2018). Esta é uma aspartil protease transmembranar do tipo I constituída por 501 aminoácidos. Está principalmente localizada em endossomas, lisossomas e na via trans-Golgi (Zhang *et al.*, 2011; Bali *et al.*, 2010; Willem *et al.*, 2009). β -secretase é sintetizada no RE como uma pró-enzima imatura com um peso molecular de 60 kDa. Posteriormente à sua síntese, esta é maturada no RE e no CG e, seguidamente, é transportada para a membrana plasmática. À semelhança do que acontece com a APP, a β -secretase é internalizada na membrana plasmática dos endossomas, o compartimento principal para a formação dos péptidos A β (Willem *et al.*, 2009). A β -secretase tem como função a clivagem da APP na posição N-terminal do péptido A β no resíduo Asp⁺¹ da sequência A β (Bali *et al.*, 2010), por remoção do ectodomínio da APP. Após a sua atividade, a β -secretase é transportada para os endossomas para ser reciclada na via trans-Golgi (Willem *et al.*, 2009).

Os níveis de ARN mensageiro (ARNm) da β -secretase são mais elevados no pâncreas e no cérebro e são significativamente menores na maioria dos outros tecidos (Bali *et al.*, 2010; Willem *et al.*, 2009). Na região cerebral, a β -secretase é altamente expressa em células neuronais, mas também pode ser expressa em astrócitos sob condição de stress crónico (Bali *et al.*, 2010). A β -secretase tem atividade máxima a pH ácido (pH=4,5), o que reflete o principal local de ação dentro da célula, os endossomas acidificados. Variações do pH intracelular podem levar a uma inibição da atividade da β -secretase (Bali *et al.*, 2010; Willem *et al.*, 2009). A atividade da β -secretase é maior em pacientes com DA esporádica. Por todas as razões mencionadas, acredita-se que a β -secretase é um importante alvo terapêutico para o desenvolvimento de novas terapias para a DA, pois é um alvo para a inibição da produção de péptidos A β (Hu *et al.*, 2018; Barage and Sonawane 2015).

A regulação dos níveis de ARNm da β -secretase, através da sua inibição por ação de diferentes microARNs (miARNs - miR-9, miR-29, miR-107, miR-195, entre outros - Tabela 4) foi descrita muito recentemente (Guo *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2015; Holohan *et al.*, 2013; Willem *et al.*, 2009). No entanto, este efeito apenas ainda foi comprovado para o miARN-29b (Pereira *et al.*, 2016) e miR-29c (Delay *et al.*, 2012). Diversos estudos apontam para esta relação, uma vez que, ao ocorrer uma diminuição dos níveis de expressão do miR-29, se verifica uma expressão anormal dos níveis de β -secretase em cérebros de pacientes com DA (Chen *et al.*, 2017; Willem *et al.*, 2009).

1.6.1.2.3. γ -Secretase

A γ -Secretase é um complexo proteolítico transmembranar de multi-subunidades pertencente à família de proteases de clivagem intramembranar (ICliPs) (Duggan and McCarthy 2016). Esta secretase é um complexo de alto peso molecular que compreende quatro componentes principais que incluem: PS1 (forma o núcleo catalítico da γ -secretase) ou PS2, Nicastrina (NCT), APH-1 e PEN-2 (Figura 8) (Audagnotto *et al.*, 2017; Cai *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2017(b); Wilkins and Swerdlow 2017; Strooper *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2011).

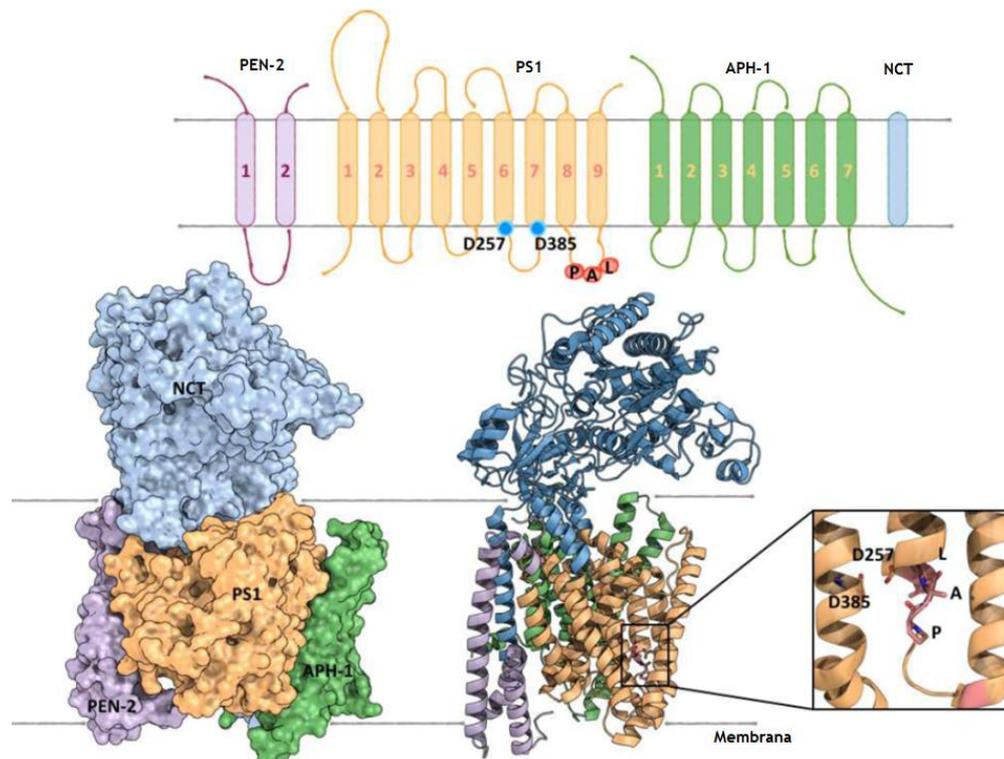


Figura 8. Arquitetura e a estrutura da γ -secretase humana. γ -secretase humana: PS1 (cor bege), APH-1 (cor verde), PEN-2 (cor violeta) e NCT (cor azul clara). O loop PAL, essencial à atividade enzimática, está realçado a vermelho, assim como os resíduos catalíticos (D257 e D385) (Adaptado de Audagnotto *et al.*, 2017).

A γ -secretase é o complexo responsável pela clivagem C-terminal intramembranar da APP, que permanece após a clivagem realizada pela α - ou β -secretase (Bali *et al.*, 2010). A clivagem realizada pela γ -secretase não ocorre apenas num único local, mas sim em três locais de clivagem na APP, separados por três aminoácidos: ϵ , γ , ζ . Esta clivagem executada pela γ -secretase ainda não está completamente esclarecida (Wilkins and Swerdlow 2017). Para além da APP, existe uma lista crescente de substratos clivados por este complexo enzimático (Audagnotto *et al.*, 2017; Cai *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2017(b); Wilkins and Swerdlow 2017; Barage and Sonawane 2015; Strooper *et al.*, 2012).

1.6.1.2.3.1. Presenilina 1

As mutações no gene da APP são apenas uma pequena percentagem dos vários tipos hereditários autossômicos dominantes da DA. Nos últimos anos, diversos estudos têm indicado mutações na região cromossômica 14q24.3 de pacientes com FAD, levando à descoberta de um novo gene, PSEN1. Foram já descobertos cerca de 185 tipos de mutações no gene da PSEN1, que não resultam em perda da sua função, uma vez que quase todas as mutações são do tipo *missense*. Estas dão origem à substituição de um único aminoácido e parece que provocam o início precoce da DA (Li *et al.*, 2017(b); Duggan and McCarthy 2016; Barage and Sonawane 2015; Strooper *et al.*, 2012; Tang and Gershon 2003). Por sua vez, estas mutações do tipo *missense* melhoram significativamente e especificamente a clivagem da γ -secretase para gerar os péptidos AB₄₂ amiloidogénicos, contribuindo assim para a formação das placas AB e, conseqüentemente, para a progressão da DA (Duggan and McCarthy 2016; Tang and Gershon 2003). A perda de função ou a diminuição da produção da PS1 resulta na diminuição da produção dos péptidos AB (Audagnotto *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2017(b); Strooper *et al.*, 2012). Deste modo, a principal atuação patológica por parte da PSEN1 mutada na DA vem da sua capacidade para facilitar a produção dos péptidos AB₄₂ amiloidogénicos (Duggan and McCarthy 2016; Tang and Gershon 2003).

Através da análise de imunohistoquímica conclui-se que a PS1 está amplamente expressa na região cerebral, nos neurónios e na glia, no entanto, existem níveis mais elevados em neurónios piramidais do hipocampo (Tang and Gershon 2003). Diversos estudos bioquímicos relataram que esta proteína possui vários segmentos membranares com um grande *loop* hidrofílico entre os domínios transmembranares (TMDs) 6 e 7 (Figura 9). A sua estrutura peculiar confere-lhe a capacidade para interagir com outras proteínas citoplasmáticas (Audagnotto *et al.*, 2017; Cai *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2017(b); Duggan and McCarthy 2016; Strooper *et al.*, 2012; Tang and Gershon 2003).

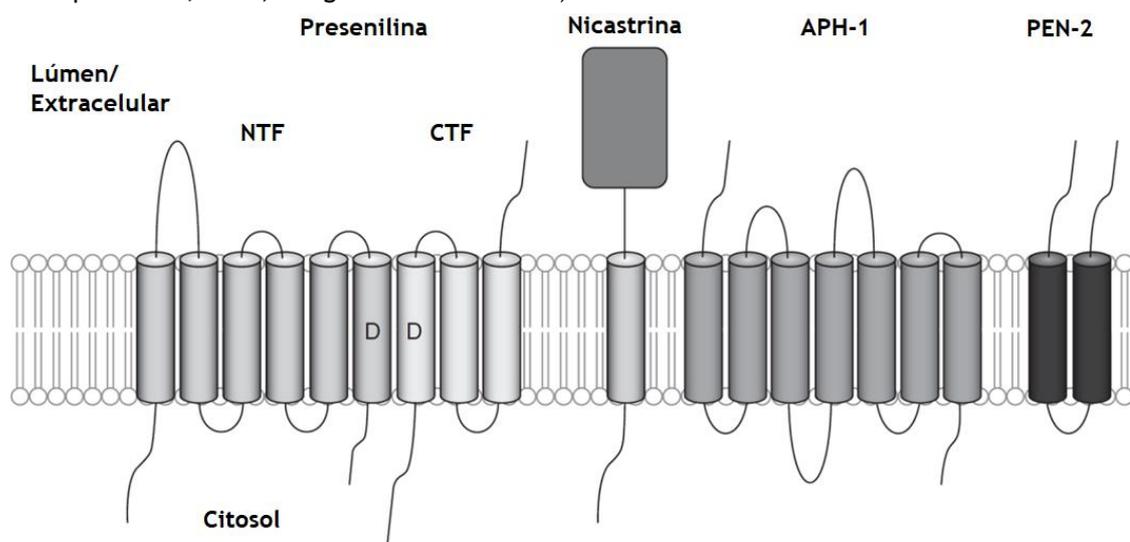


Figura 9. Componentes da γ -secretase, com ênfase na presenilina (Adaptado de Strooper *et al.*, 2012).

A inibição da expressão da PS1 e, conseqüentemente, do local ativo da γ -secrease poderá ser uma terapia eficaz para DA (Barage and Sonawane 2015; Strooper *et al.*, 2012; Tang and Gershon 2003).

1.6.1.2.4. Péptido β -Amilóide

Como mencionado, o péptido AB é o produto resultante da clivagem proteolítica da APP transmembranar, pela ação sequencial da β - e γ -secretase (Dries *et al.*, 2017). Este péptido apresenta um peso molecular de 4 kDa (Grimm *et al.*, 2013) e um comprimento que varia de 38 a 43 aminoácidos (dependendo do local da clivagem realizada pela γ -secretase), sendo predominantemente constituído por 40 ou 42 aminoácidos. O péptido AB é normalmente secretado pelas células saudáveis, mas a sua função fisiológica normal permanece desconhecida. Sob condições fisiológicas normais, o péptido AB₄₀ constitui cerca de 90% da quantidade total de péptidos AB. Das duas principais espécies de AB, AB₄₀ e AB₄₂, a AB₄₂ é a mais propensa à agregação, devido à adição de dois aminoácidos hidrofóbicos, que o tornam mais hidrofóbico e insolúvel (Barage and Sonawane 2015; Zolezzi *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2011; Bali *et al.*, 2010).

Ambos os oligómeros e placas demonstraram ter propriedades tóxicas, incluindo a disfunção sináptica, fosforilação da proteína Tau, dano mitocondrial, ativação de microglia e neurodegeneração (Bali *et al.*, 2010; Willem *et al.*, 2009). A deposição dos péptidos AB e, conseqüentemente, a formação das placas AB, leva à ativação microglial local, à libertação de citocinas, à astrocitose reativa e a uma resposta inflamatória multi-proteica (Figura 10).



Figura 10. Hipótese da cascata amilóide (Adaptado de Barage and Sonawane 2015).

Uma concentração excessiva de péptidos A β provoca uma disfunção sináptica, enquanto que, baixas concentrações de péptidos A β aumenta a estimulação, a longo prazo, do hipocampo e da memória. Deste modo, os péptidos A β podem inibir/prevenir a morte de células neuronais em concentrações na ordem de picomolar (Zhang *et al.*, 2011). Por conseguinte, acredita-se que o péptido A β desempenha um papel central na patogénese da DA, sendo imperativo compreender a base molecular e celular da sua produção, para posteriormente procurar mecanismos de inibição, sempre que estes apresentam concentrações elevadas/tóxicas para as células neuronais (Bali *et al.*, 2010).

1.7. Patologia Tau

A formação dos NFTs não é uma característica exclusiva da DA pois pode ocorrer noutras doenças neurodegenerativas, conhecidas como tauopatias (Bali *et al.*, 2010). A hipótese da cascata amilóide propõe que as alterações na proteína Tau e, conseqüentemente, a formação dos emaranhados neurofibrilares, podem ser desencadeadas por concentrações tóxicas de péptido A β (Briggs *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2015; Ribeiro *et al.*, 2013; Ballard *et al.*, 2011; O'Brien and Wong 2011; Bali *et al.*, 2010).

A proteína tau é uma proteína associada aos microtúbulos, estando envolvida na sua montagem e estabilização (Shaik *et al.*, 2018; Bali *et al.*, 2010). Num cérebro normal, existe um equilíbrio entre as fosforilações e desfosforilações da proteína Tau, o que permite manter a estabilidade do citoesqueleto e, conseqüentemente, a morfologia axonal dos neurónios. No entanto, a primeira modificação encontrada em cérebros de indivíduos com DA consiste na hiperfosforilação da proteína Tau, por ação de diferentes proteínas, através da ativação de cinases e inibição de fosfatases, que provocam mudanças estruturais e conformacionais na proteína Tau (Briggs *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2015; Barage and Sonawane 2015; Ballard *et al.*, 2011; Bali *et al.*, 2010). Assim, esta fosforilação excessiva da proteína Tau neurofibrilar é provocada especialmente pelo aumento da atividade de cinases, nomeadamente da *glycogen synthase kinase-3* (GSK-3), da CDK5 (Shaik *et al.*, 2018; Dries *et al.*, 2017; Guo *et al.*, 2017; Barage and Sonawane 2015; O'Brien and Wong 2011) e da *MAP/microtubule affinity-regulating kinase* (MARK) (Shaik *et al.*, 2018; Guo *et al.*, 2017), que são ativadas pelos oligómeros A β . No entanto, a inibição de algumas fosfatases, incluindo a *protein phosphatase 2A* (PP2A) e a calcineurina, desempenha também um papel crucial, que culmina na agregação e formação de NFTs (Guo *et al.*, 2017; Kumar *et al.*, 2015; Barage and Sonawane 2015; Ballard *et al.*, 2011; Bali *et al.*, 2010). De uma forma geral, a fosforilação anormal e excessiva leva à libertação da proteína Tau dos microtúbulos e, conseqüentemente, à sua agregação no citosol. As proteínas Tau hiperfosforiladas são, posteriormente, polimerizadas em NFTs (Shaik *et al.*, 2018; Dries *et al.*, 2017; Kumar *et al.*, 2015; Barage and Sonawane 2015; Ballard *et al.*, 2011; Bali *et al.*, 2010). A perda da função normal da proteína Tau leva a um distúrbio patológico nas funções estruturais e regulatórias do citoesqueleto das células neuronais, provocando alterações nas funções neuronais normais, tais como a manutenção de uma morfologia apropriada, transporte axonal, disfunção sináptica e neurodegeneração (Barage and Sonawane 2015). Estas mudanças estruturais e conformacionais da proteína Tau afetam tanto a sua ligação com a tubulina, como a sua capacidade de promover a agregação dos microtúbulos (Kumar *et al.*, 2015; Barage and Sonawane 2015; Ballard *et al.*, 2011; Bali *et al.*, 2010). Assim, os vários eventos patogénicos, provocados pelas elevadas concentrações de A β contribuem para a hiperfosforilação, *misfolding* e agregação da proteína Tau (Barage and Sonawane 2015).

As terapias anti-Tau visam inibir estas cinases e a agregação da proteína Tau no citosol, mas também visam estimular a ação das fosfatases (Barage and Sonawane 2015; Bali *et al.*, 2010). Por outro lado, pode-se ainda inibir a hiperfosforilação da Tau inibindo a produção de péptidos A β , inibindo assim a montante o mecanismo de hiperfosforilação da proteína Tau.

1.8. Tratamento

Atualmente a DA, bem como outras doenças neurodegenerativas (DNs), não têm um tratamento eficaz e não é conhecida cura para estas doenças. Apesar do aumento da taxa de incidência para a DA, o diagnóstico é realizado tardiamente, o que leva ao aumento da gravidade da doença (Small and Bullock, 2011). Embora existam muitas pesquisas sobre como tratar a DA, ainda há muito por descobrir, nomeadamente, sobre as alterações biológicas que causam a doença, o porquê da sua progressão ocorrer mais rapidamente nalguns indivíduos do que noutros e como se pode prevenir, retardar ou curar esta patologia (Gaugler *et al.*, 2017; Bali *et al.*, 2010). O foco principal dos tratamentos farmacológicos atualmente disponíveis para a DA incide na diminuição da progressão dos sintomas, procurando conduzir a uma melhoria das funções cognitivas, usando por exemplo inibidores da acetilcolinesterase ou a memantina, ou na redução da disfunção comportamental, recorrendo a anti-depressivos e anti-psicóticos (Shaik *et al.*, 2018; Briggs *et al.*, 2016) (Figura 11).

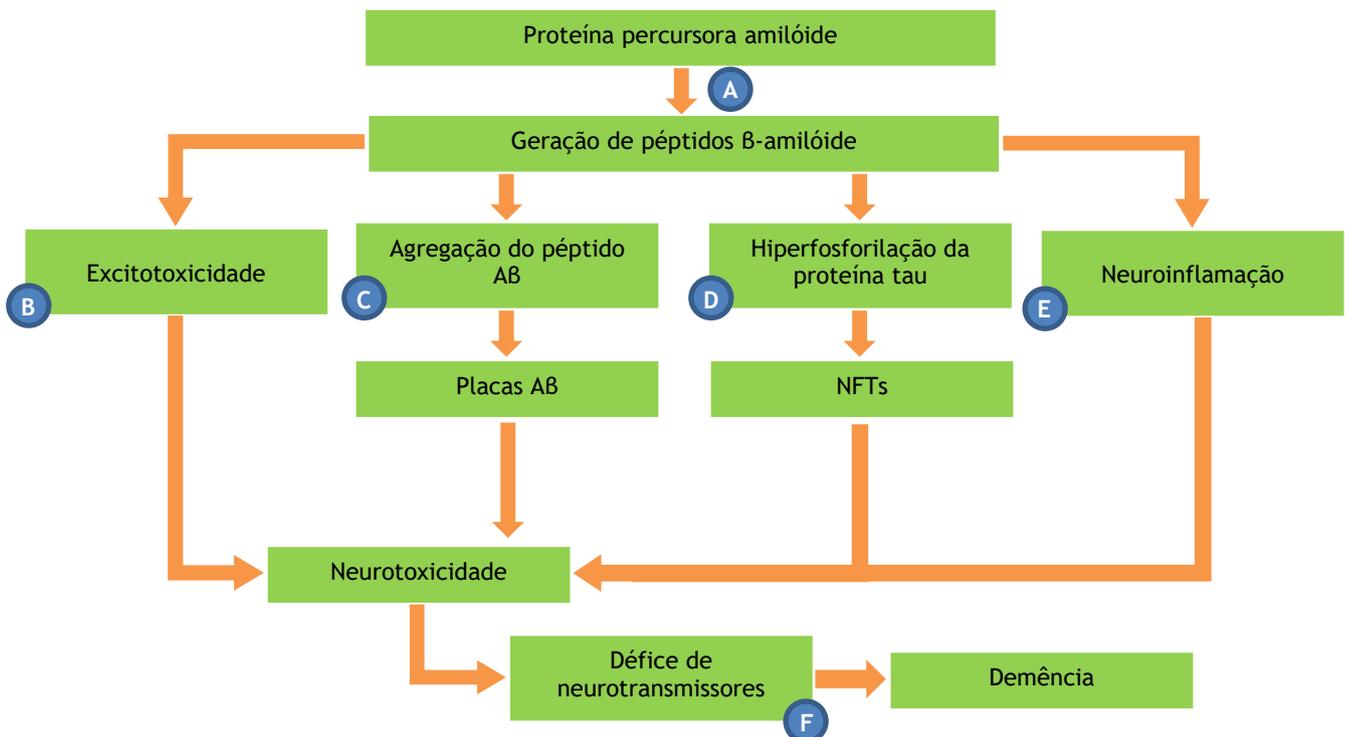


Figura 11. Etiologia da DA com alvos terapêuticos. A - Inibidores da enzima secretase; B - Moduladores do receptor N-metil-D-aspartato, como por exemplo: Memantina; C - Imunoterapia, incluindo imunização e terapia anti-amilóide direta, com anticorpos monoclonais; D - Terapia anti-tau; E - Tratamentos anti-inflamatórios, com anti-inflamatórios não esteróides; F - Inibidores da anti-colinesterase, como por exemplo: donepezil. NFTs = emaranhados neurofibrilares (Adaptado de Shaik *et al.*, 2018 e Briggs *et al.*, 2016).

Isto é possível devido à diminuição ou supressão do dano e à destruição de neurónios que causam os sintomas (Briggs *et al.*, 2016). De facto, os seis medicamentos atualmente aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento da DA, são apenas fármacos sintomáticos, que diminuem temporariamente os sintomas, através do aumento da quantidade de neurotransmissores no cérebro (Briggs *et al.*, 2016; Bali *et al.*, 2010).

Existem inúmeros fatores que contribuem para a dificuldade no desenvolvimento de tratamentos efetivos para a DA, tais como o elevado custo associado ao desenvolvimento de medicamentos, o tempo relativamente extenso para se poder observar se um tratamento altera ou não a progressão da doença e, por fim, mas não menos importante, a estrutura cerebral protegida pela barreira hematoencefálica (BBB) (Gaugler *et al.*, 2017). Deste modo, os fármacos desenvolvidos deverão apresentar uma dimensão reduzida para poderem atravessar a BBB e diminuir, mas não eliminar, a atividade da β - ou γ -secretase. Por outro lado, os inibidores da γ -secretase devem ser projetados de forma a que não interfiram significativamente com a clivagem de outros substratos da γ -secretase, incluindo Notch e outros recetores de superfície celular, que têm papéis vitais no desenvolvimento, na hematopoiese e na adesão celular (Shaik *et al.*, 2018; Bali *et al.*, 2010). Apesar destas questões, as estratégias anti-amilóides estão em ascensão. As estratégias anti-amilóides, pela inibição da expressão de secretases β e γ , permitem uma melhoria das funções cognitivas. Deste modo, devido à interação dos péptidos AB com os NFTs (tauopatia), os inibidores da produção de AB podem atuar em duas vertentes da DA, uma vez que, ao diminuir os péptidos AB se diminui também a formação de NFTs (Gaugler *et al.*, 2017; Briggs *et al.*, 2016; Bali *et al.*, 2010).

Uma abordagem promissora relaciona-se com a utilização de miARNs (miRs) para a inibição da expressão de várias proteínas envolvidas no surgimento e progressão da DA. No âmbito deste trabalho irão estudar-se os miARNs, mais concretamente o efeito do pre-miR-9 e pre-miR-29b, como agentes terapêuticos na DA.

1.9. ARN interferência

Possivelmente, uma das descobertas mais importantes na biologia molecular nos últimos anos foi a descoberta e caracterização de ARNs regulatórios (Shaik *et al.*, 2018; Daugaard and Hansen 2017; Goodall *et al.*, 2013; Czech and Hannon 2011; MacFarlane and Murphy 2010). O ARN de interferência (ARNi) é utilizado para controlo da expressão de genes em muitos organismos, desde protozoários a humanos (Khalil *et al.*, 2015). Esta tecnologia foi descoberta pela primeira vez em células vegetais, mas não foi amplamente observada em células animais, até Fire e colaboradores (Fire *et al.*, 1998) demonstrarem que o ARN de cadeia dupla (dsARN) provoca a degradação das sequências de ARNm complementares (Xu and Wang 2015; Che *et al.*, 2014). O ARNi tem apresentado um grande potencial no silenciamento de determinados genes, através da utilização de pequenos ARNs de interferência, tornando-se cada vez mais uma estratégia auspiciosa para o tratamento de doenças hereditárias ou

adquiridas, devido à sua elevada especificidade, efeito significativo, menores efeitos colaterais e facilidade de síntese (Reddy *et al.*, 2017; Xu and Wang 2015). Os ARNs têm entre 15 a 25 nucleótidos que se formam a partir da fragmentação de precursores maiores e são classificados em três grandes grupos: miARN, *small interfering* ARN (sARNi) e *piwi-interacting* ARN (pARNi) (Pereira *et al.*, 2016; Durán *et al.*, 2015; Goodall *et al.*, 2013; Czech and Hannon 2011; MacFarlane and Murphy 2010).

1.9.1. Aplicações do microARN

Os miARNs podem ser usados nas DNs como agentes terapêuticos, devido ao seu enorme potencial para o silenciamento da expressão de genes associados ao surgimento e progressão dessas doenças (Issler and Chen 2015). Por outro lado, existem ainda várias evidências que certos miARNs endógenos circulam extracelularmente de forma estável em fluidos biológicos, tais como sangue, linfa, urina, saliva e líquido cefalorraquidiano, podendo também ser usados como biomarcadores promissores (Pereira *et al.*, 2017; Femminella *et al.*, 2015; Issler and Chen 2015; Delay *et al.*, 2012). Deste modo, a partir dos níveis de expressão dos miARNs, estes podem ser utilizados como biomarcadores não invasivos para fins de diagnóstico e alertar para um possível tratamento (Figura 12) (Batistela *et al.*, 2017; Hong *et al.*, 2017; Issler and Chen 2015).

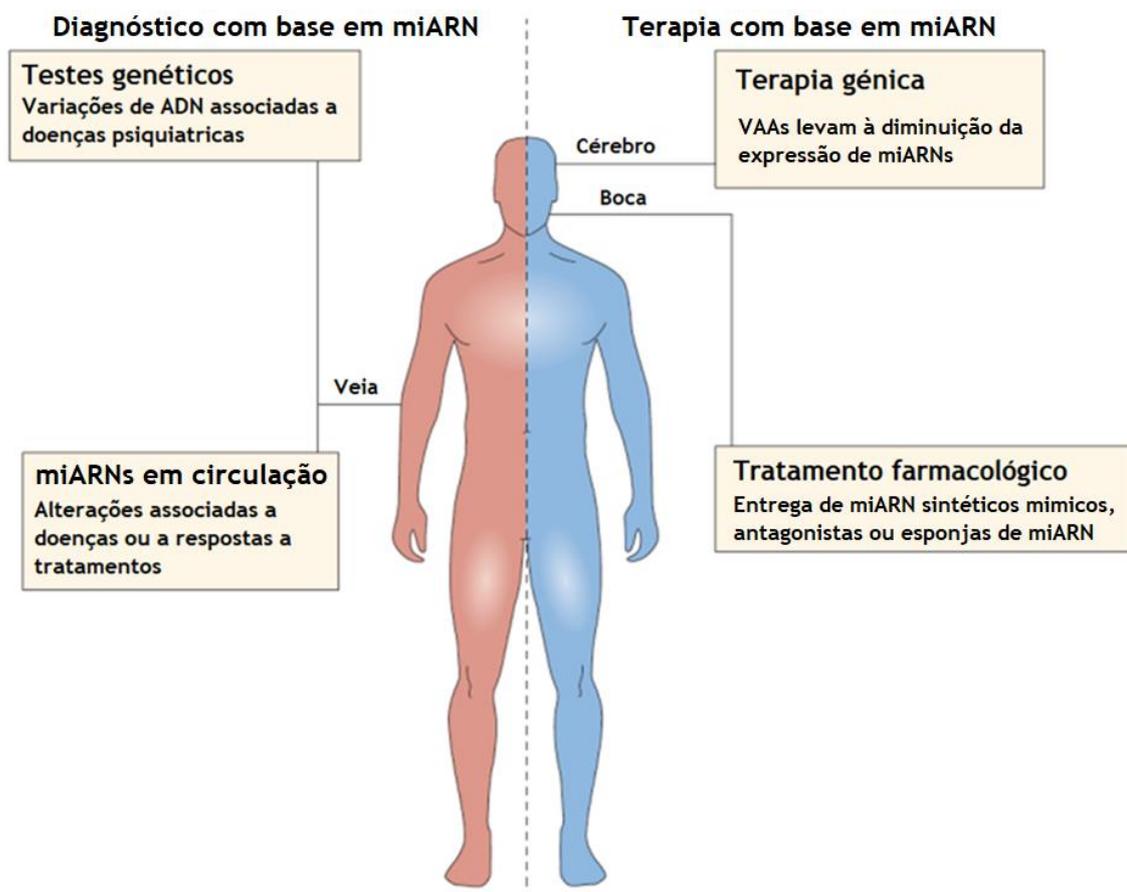


Figura 12. Diferentes usos de miARN para diferentes doenças, usado tanto para diagnóstico como para terapêutica. VAAs - Vírus adeno-associados (Adaptado de Issler and Chen 2015).

1.9.2. Caraterização do miARN

Atualmente, os miARNs representam a classe de ARNs não codificantes mais estudada (Daugaard and Hansen 2017; Pereira *et al.*, 2017). Como anteriormente foi referido, os miARNs são moléculas de ARN de cadeia simples, 15 a 25 nucleótidos, que atuam como potentes reguladores pós-transcrição da expressão génica (Shaik *et al.*, 2018). Resumidamente, este mecanismo de atuação visa suprimir o processo de tradução, permitindo assim a redução dos níveis proteicos associados ao surgimento e progressão de uma determinada doença (Idda *et al.*, 2018; Shaik *et al.*, 2018; Daugaard and Hansen 2017; Pereira *et al.*, 2017; Femminella *et al.*, 2015; Goodall *et al.*, 2013; MacFarlane and Murphy 2010).

Uma característica importante destes ARNs não codificantes é que um miARN individual pode regular até algumas centenas de ARNm alvo diferentes. No entanto, esta característica pode ser desvantajosa devido a possíveis efeitos inespecíficos que podem ocorrer durante a regulação génica, como a indução de múltiplos efeitos na expressão em vários genes relacionados, suprimindo a expressão de diferentes proteínas implicadas em vários processos biológicos. Outro ponto a ter em consideração é que os miARNs introduzidos artificialmente podem sobrecarregar a maquinaria celular envolvida na biogénese dos miARNs e prejudicar a eficiência/ação dos miARNs endógenos (Goodall *et al.*, 2013). Porém, múltiplos miARNs podem regular a expressão de um único ARNm alvo, provavelmente através de uma atuação sinérgica (Pereira *et al.*, 2017; Delay *et al.*, 2012). Devido a essa característica, uma possível terapia, é a introdução de miARNs que regulem a expressão de certas proteínas envolvidas no surgimento e progressão da doença. Contudo, a dosagem, o modo de entrega e o seu efeito no organismo são também fatores importantes a ter em consideração no desenvolvimento de uma estratégia terapêutica com o uso de miARNs.

1.9.3. Biogénese do miARN

A formação de um transcrito primário de miARN (pri-miARN) é iniciada com a transcrição do gene pela ARN polimerase II. De seguida, o pri-miARN é clivado, ainda no núcleo, por um complexo microprocessador constituído pela RNase III em conjunto com a proteína Drosha e a subunidade do complexo microprocessador da região crítica da síndrome de DiGeorge 8 (DGCR8), originando o miARN precursor (pre-miARN), com cerca de 70 a 110 nucleótidos (Shaik *et al.*, 2018; Daugaard and Hansen 2017; Pereira *et al.*, 2017; Issler and Chen 2015; MacFarlane and Murphy 2010; Filho and Kimura 2006). Posteriormente, o pre-miARN é transportado rapidamente para o citoplasma pela Exportina-5 (Exp5), proteína de exportação nuclear, através de um mecanismo dependente de Ran-GTP. Já no citoplasma o pre-miARN é processado pela nuclease Dicer e os seus cofatores, a proteína de ligação TAR ARN (TRBP ou TARBP2) e a proteína cinase ativadora de ARN (PACT), formando um miARN maduro de dupla

cadeia, com cerca de 22 nucleótidos (Figura 13) (Shaik *et al.*, 2018; Daugaard and Hansen 2017; Pereira *et al.*, 2017; Gomes *et al.*, 2015; Issler and Chen 2015; Goodall *et al.*, 2013; Siomi and Siomi 2009). Em seguida, os miARNs maduros de cadeia dupla (miARN-miARN* *duplex*), onde o miARN é a cadeia *antisense* (cadeia guia) e o miARN* é a cadeia *sense* (cadeia passageira), são rapidamente incorporados no complexo enzimático RISC, constituído principalmente por proteínas Argonautes (Ago). Após a incorporação do miARN maduro no complexo RISC, a cadeia miARN* é libertada e direcionada para a clivagem endonucleolítica pela subunidade catalítica Argonaute 2 (Ago2). Apenas a cadeia miARN é carregada no RISC para formar o complexo de silenciamento de miARN (miRISC), o qual identifica o ARNm alvo, através da complementaridade de bases existente entre a sequência do ARNm e a sequência do miARN, regulando deste modo a expressão pós-transcricional das proteínas-alvo (Figura 13) (Daugaard and Hansen 2017; Pereira *et al.*, 2017; Reddy *et al.*, 2017; Femminella *et al.*, 2015; Gomes *et al.*, 2015; Issler and Chen 2015; Goodall *et al.*, 2013; MacFarlane and Murphy 2010; Siomi and Siomi 2009; Filho and Kimura 2006).

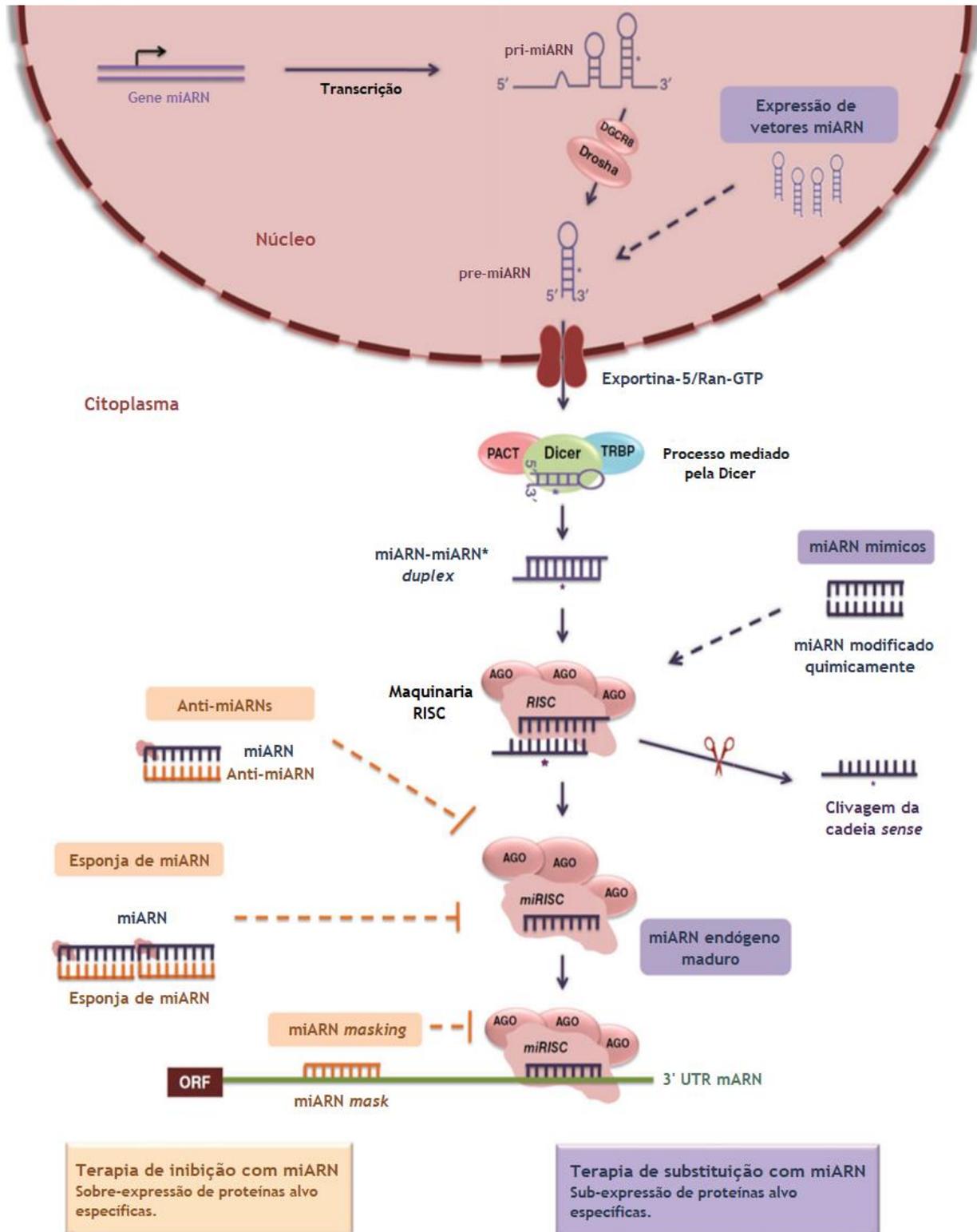


Figura 13. Representação esquemática da biogênese de miARN e o seu envolvimento em abordagens terapêuticas (Adaptado de Pereira *et al.*, 2017).

A regulação pós-transcricional ocorre pela ligação entre a cadeia de miARN madura e os transcritos de ARN alvo, através do reconhecimento de locais específicos (*seed sequence* de 2 a 8 nucleótidos), localizados na região 3' não traduzida (3'- UTR) do ARNm alvo e na região final da extremidade 5' do miARN (Figura 14), que dependendo do grau de complementaridade existente entre as bases, pode resultar no silenciamento do ARNm alvo, seja pela sua degradação, destabilização (deadenilação) ou bloqueio/repressão da tradução de ARNm alvo em proteínas (Shaik *et al.*, 2018; Daugaard and Hansen 2017; Pereira *et al.*, 2017; Reddy *et al.*, 2017; Issler and Chen 2015; Yang *et al.*, 2015; Delay *et al.*, 2012; Menck 2010).

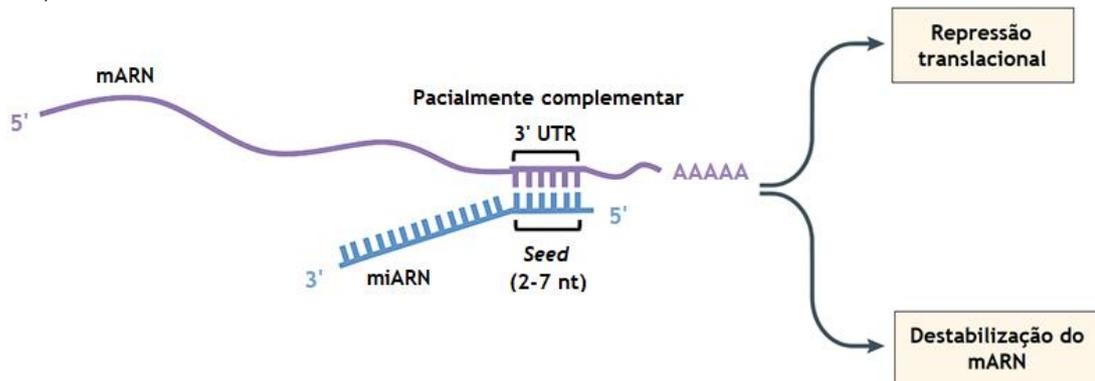


Figura 14. Representação esquemática do silenciamento do ARNm alvo (Adaptado de Lam *et al.*, 2015).

1.9.4. Desafios de uma aplicação terapêutica eficaz baseada em miARN

Como já foi referido, uma aplicação terapêutica utilizando miARN é extremamente promissora devido à sua eficiência, versatilidade, durabilidade do silenciamento da expressão génica, bem como à sua simplicidade, segurança e facilidade na obtenção do miARN. No entanto, para um desenvolvimento terapêutico de sucesso com uso de miARN no sistema nervoso central (SNC), para além da BBB, é necessário ter em conta inúmeros obstáculos e desafios, nos quais se incluem, barreiras intracelulares e extracelulares (Pereira *et al.*, 2017; Issler and Chen 2015). Deste modo é necessário uma forma efetiva e eficaz para administrar ARNs, mais propriamente miARNs no cérebro, capaz de atravessar a BBB, exercendo uma função terapêutica, procurando diminuir ou eliminar efeitos colaterais indesejados e aumentando a atividade e eficiência dos miARNs administrados nos locais alvo (Pereira *et al.*, 2017).

A capacidade de certos fármacos para atravessarem a BBB depende de vários fatores, tais como o tamanho molecular (<500 Da), a carga e lipofilicidade. Devido a estes fatores e às propriedades físico-químicas do ARN, as estratégias terapêuticas com miARN apresentam limitações na capacidade de atravessar a BBB (Pereira *et al.*, 2017). Além disso, as barreiras intracelulares, tais como a entrega inespecífica do miARN (órgãos, tecidos ou células), a absorção celular ineficiente e o processamento intracelular dos ARNs alvo nos endossomas (baixa excisão do endossoma, liberação vetorial inadequada e processamento ineficaz pela maquinaria do ARNi) necessitam de ser ultrapassadas. As barreiras extracelulares são também um grande obstáculo à entrega e aplicação do ARN, uma vez que são responsáveis pela baixa biodisponibilidade do ARN em circulação, pela degradação enzimática do ARN pelas nucleases existentes na corrente sanguínea, pela rápida eliminação renal, pela fagocitose através de monócitos e macrófagos, pela opsonização pelos complementos sanguíneos (lipoproteínas, imunoglobulinas, eritrócitos e proteínas séricas), pela difusão através da matriz celular e, por fim, pela toxicidade indesejável devido a uma resposta imune e/ou efeitos não desejados (Figura 15) (Pereira *et al.*, 2017). Tendo tudo isto em conta, é crucial o desenvolvimento de um método de entrega que ultrapasse todas estas barreiras e entregue o miARN de forma eficaz e segura.

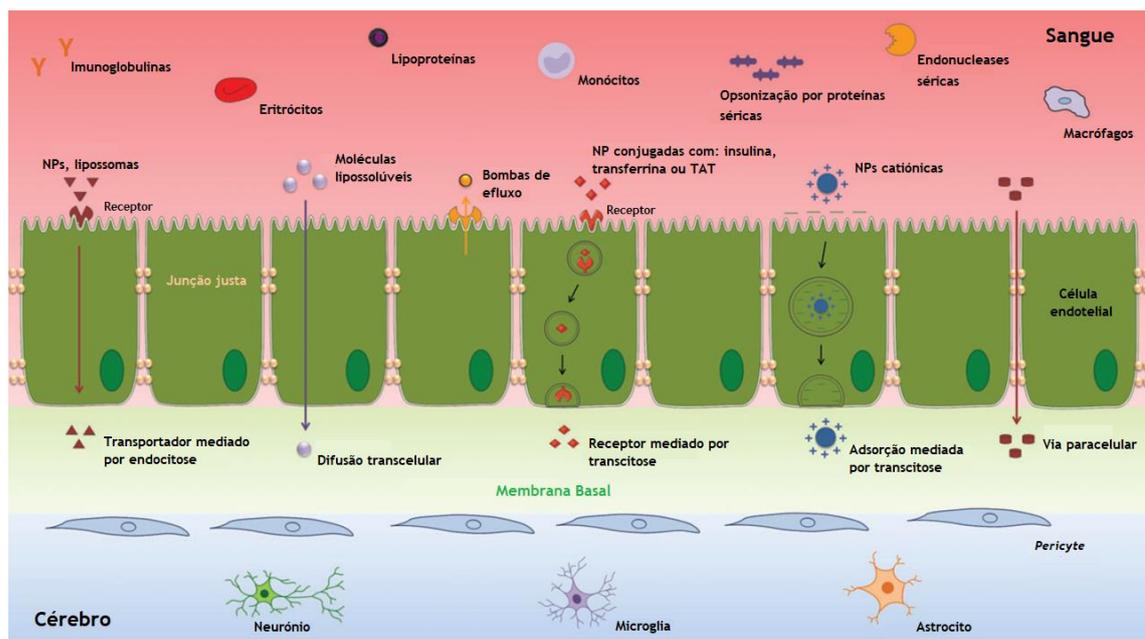


Figura 15. Principais barreiras encontradas na entrega *in vivo* de microARNs e mecanismos de transporte através da barreira hematoencefálica (Adaptado de Pereira *et al.*, 2017).

1.9.5. miARNs envolvidos na doença de Alzheimer

Na última década, inúmeros estudos científicos demonstraram que uma fonte particularmente diversificada de miARNs está presente no sistema nervoso e que apresentam um padrão de expressão específico (Pereira *et al.*, 2017; Femminella *et al.*, 2015; Goodall *et al.*, 2013). No que diz respeito à função dos miARNs no sistema nervoso central, diversos investigadores concluíram que os miARNs são reguladores cruciais durante a fase de neurogênese, maturação e que apresentam um papel modulatório no envelhecimento e nas DNs (Shaik *et al.*, 2018; Guo *et al.*, 2017). Existem várias evidências que demonstraram que as DNs são causadas por alterações genéticas e/ou epigenéticas nos genes que codificam as proteínas envolvidas no surgimento e progressão destas doenças. Como já mencionado, os miARNs regulam a expressão de inúmeros genes neuronais envolvidos em vários processos celulares, tais como o crescimento de neurites, morfologia dendrítica espinhal, diferenciação neuronal e a plasticidade sináptica (Roshan *et al.*, 2014; Goodall *et al.*, 2013). Juntamente com o seu perfil de expressão nas DNs, levaram a avanços impressionantes para novos diagnósticos, controlos na progressão das DNs, desenvolvimento de fármacos e respostas aos tratamentos dessas patologias (Pereira *et al.*, 2017; Reddy *et al.*, 2017). Na verdade, a desregulação dos níveis de expressão dos miARNs e a sua disfunção no cérebro foram associadas à patogénese de várias DNs, incluindo a doença de Alzheimer (Tabela 4) (Batistela *et al.*, 2017; Guo *et al.*, 2017; Pereira *et al.*, 2017; Reddy *et al.*, 2017; Müller *et al.*, 2016; Goodall *et al.*, 2013; Holohan *et al.*, 2013; Delay *et al.*, 2012; Maes *et al.*, 2009).

Tabela 4. Identificação de microARNs associados à doença de Alzheimer, relacionando os miARNs com os seus genes/proteínas alvo.

MicroARN	Gene alvo	Sobre/sub-expresso	Referências
let-7	APP	Sub-expresso	Maes <i>et al.</i> , 2009.
miR-9	BACE1, PSEN1, NFH, SIRT1	Sobre/sub-expresso	Idda <i>et al.</i> , 2018; Batistela <i>et al.</i> , 2017; Delay <i>et al.</i> , 2012; Maes <i>et al.</i> , 2009.
miR-16	APP	Sub-expresso	Idda <i>et al.</i> , 2018; Reddy <i>et al.</i> , 2017.
miR-20a	APP	-	Idda <i>et al.</i> , 2018.
miR-27a-3p	PSEN1	Sub-expresso	Idda <i>et al.</i> , 2018.
miR-29	BACE1	Sub-expresso	Shaik <i>et al.</i> , 2018; Reihaneh <i>et al.</i> , 2017; Femminella <i>et al.</i> , 2015; Delay <i>et al.</i> , 2012.
miR-98-5-p	BACE1	Sobre-expresso	Reihaneh <i>et al.</i> , 2017.
miR-101	APP	Sub-expresso	Shaik <i>et al.</i> , 2018; Idda <i>et al.</i> , 2018; Reddy <i>et al.</i> , 2017; Delay <i>et al.</i> , 2012.
miR-106a/b	APP	Sub-expresso	Femminella <i>et al.</i> , 2015; Goodall <i>et al.</i> , 2013; Delay <i>et al.</i> , 2012.
miR-107	BACE1	Sub-expresso	Shaik <i>et al.</i> , 2018; Reihaneh <i>et al.</i> , 2017.
miR-124a	BACE1	Sub-expresso	Shaik <i>et al.</i> , 2018; Idda <i>et al.</i> , 2018; Batistela <i>et al.</i> , 2017; Reddy <i>et al.</i> , 2017.
miR-135b	BACE1	Sub-expresso	Reddy <i>et al.</i> , 2017.
miR-144	BACE1	Sub-expresso	Reihaneh <i>et al.</i> , 2017.
miR-147	APP	-	Idda <i>et al.</i> , 2018.
miR-153	APP	Sub-expresso	Shaik <i>et al.</i> , 2018; Goodall <i>et al.</i> , 2013; Holohan <i>et al.</i> , 2013.
miR-186	BACE1	Sub-expresso	Idda <i>et al.</i> , 2018.
miR-188-3p	BACE1	Sub-expresso	Idda <i>et al.</i> , 2018; Reddy <i>et al.</i> , 2017.
miR-193b	APP	Sub-expresso	Reddy <i>et al.</i> , 2017.
miR-195	BACE1, Tau	Sub-expresso	Shaik <i>et al.</i> , 2018; Idda <i>et al.</i> , 2018; Holohan <i>et al.</i> , 2013.
miR-200b	BACE1	Sub-expresso	Reihaneh <i>et al.</i> , 2017.
miR-298/328	BACE1	Sub-expresso	Maes <i>et al.</i> , 2009.
miR-339-5p	BACE1	Sub-expresso	Idda <i>et al.</i> , 2018; Reddy <i>et al.</i> , 2017.
miR-384	APP, BACE1	Sub-expresso	Batistela <i>et al.</i> , 2017; Reihaneh <i>et al.</i> , 2017.

Como demonstrado na Tabela 4, muitos miARNs têm sido associados à regulação de genes-chave que estão envolvidos e alterados na DA.

1.9.5.1. miR-9

Um vasto conjunto de miARNs tem sido identificado como estando envolvidos no surgimento e progressão da DA, entre os quais o miR-9, um miARN altamente conservado e enriquecido no cérebro (Shaik *et al.*, 2018; Coolen *et al.*, 2013; Goodall *et al.*, 2013; Schonrock *et al.*, 2010). Este é codificado por três genes diferentes e é um dos miARNs cuja expressão se encontra alterada com maior frequência na DA (Guo *et al.*, 2017; Femminella *et al.*, 2015; Van den Hove *et al.*, 2014; Coolen *et al.*, 2013). Embora ainda existam discrepâncias e incoerências relativamente ao seu papel específico e ao seu padrão de expressão na DA, já se sabe que miR-9 pode participar ativamente na manutenção dos neurónios e na formação dos péptidos AB (Reddy *et al.*, 2017; Goodall *et al.*, 2013; Holohan *et al.*, 2013; Schonrock *et al.*, 2010). Até ao momento, vários estudos demonstraram que a expressão do miR-9 se encontra significativamente aumentada no neocórtex do hipocampo e no lobo temporal do cérebro de doentes com DA. Assim, esta sobre-expressão poderá indicar que o miR-9 pode desempenhar um papel patológico na DA (Guo *et al.*, 2017; Holohan *et al.*, 2013; Delay *et al.*, 2012; Aydemir *et al.*, 2011; Schonrock *et al.*, 2010). Contrariamente, outros estudos demonstraram que o miR-9 estava sub-expresso, especialmente no hipocampo, no córtex temporal anterior, cerebelo e no giro frontal médio do cérebro de doentes com DA (Batistela *et al.*, 2017; Reddy *et al.*, 2017; Chang *et al.*, 2014; Van den Hove *et al.*, 2014; Coolen *et al.*, 2013; Holohan *et al.*, 2013). É de salientar que os estudos que referiram que o miR-9 está sub-expresso são fundamentados em resultados obtidos a partir de culturas primárias de neurónios com adição de péptidos AB, resultando numa rápida diminuição do miR-9 *in vitro*, o que sugere que a desregulação deste miARN poderá estar relacionada com a formação da placa AB e, conseqüentemente com o desenvolvimento da DA (Femminella *et al.*, 2015; Goodall *et al.*, 2013; Schonrock *et al.*, 2010).

Segundo a literatura, os alvos do miR-9 na DA incluem a β -secretase (Batistela *et al.*, 2017; Reddy *et al.*, 2017; Holohan *et al.*, 2013); PS1 (Maes *et al.*, 2009); neurofilamento de cadeia pesada (NFH), que pode ser isolado de NFTs juntamente com a proteína tau e outras proteínas do citoesqueleto e a sirtuina 1 (SIRT1), uma desacetilase que interage com a proteína tau, levando à acumulação de formas hiperfosforiladas da proteína tau sempre que a sua expressão é baixa (Batistela *et al.*, 2017; Femminella *et al.*, 2015; Goodall *et al.*, 2013; Delay *et al.*, 2012; Aydemir *et al.*, 2011; Schonrock *et al.*, 2010). Alguns estudos sugerem que o miR-9 pressupõe a segmentação da região 3'-UTR da β -secretase, um elemento-chave da via amilóide. Esta interação apoia a regulação negativa do miR-9, observada na DA, resultando no aumento da expressão da β -secretase e, conseqüentemente, no aumento da produção do péptido AB₄₂ (Reddy *et al.*, 2017; Holohan *et al.*, 2013). A inibição do miR-9 provoca a deslocação da β -secretase em rafts lipídicos, através da ação da serina *palmitoyltransferase*,

resultando num processamento excessivo da APP em péptidos AB (Reddy *et al.*, 2017). Relativamente à ação do miR-9 na PS1, estudos em tecido cerebral de ratinhos *knockout* PS1, demonstraram que a sub-expressão do miR-9 coincide com a neurodegeneração nesses mesmos ratinhos (Reddy *et al.*, 2017), o que comprova que existe uma relação entre a PS1 e o miR-9. Outros estudos também prevêem que o miR-9 tem ação na PS1, sugerindo que o aumento da PS1 poderá estar associado à diminuição dos níveis de miR-9 na DA (Maes *et al.*, 2009). Outro alvo do miR-9 é o NFH, sendo o seu modo de atuação muito similar à dos anteriormente descritos, ou seja, o NFH está sobre-expresso na DA e possivelmente a sua expressão aumentada está relacionada com a diminuição dos níveis de miR-9. Como referido anteriormente, alguns estudos demonstraram que o miR-9 está sub-expresso em resposta ao tratamento com AB em neurónios primários, o que sugere que a redução do miR-9 poderá ser uma consequência da patogénese da doença e resultar na sobre-expressão do NFH (Goodall *et al.*, 2013; Delay *et al.*, 2012). Quanto ao modo de atuação do miR-9 na SIRT1, é de referir que os níveis de SIRT1 na DA são inferiores aos de um cérebro saudável e ao contrário do NFH, a diminuição dos níveis de SIRT1 apontam para um aumento na expressão do miR-9. Assim sendo, estes resultados sugerem que o miR-9 pode proteger contra a progressão da DA, através da inibição da expressão da SIRT1 (Batistela *et al.*, 2017; Femminella *et al.*, 2015; Goodall *et al.*, 2013; Delay *et al.*, 2012).

Em resumo podemos inferir que a sobre-expressão do miR-9 em estadios precoces da DA vai retardar a patologia Tau pela inibição da expressão da SIRT1. Por sua vez, quando a patologia amilóide se verifica, a expressão do miR-9 está diminuída, resultando num aumento da expressão da β -secretase, PS1 e da incorporação da proteína tau e NFH nos NFTs (Delay *et al.*, 2012).

1.9.5.2. miR-29

Outro miARN importante e que está associado à DA é o miR-29 (Pereira *et al.*, 2016; Pereira *et al.*, 2014). Vários estudos demonstraram que este miARN se encontra sub-expresso no córtex do lobo parietal de indivíduos com DA, mas também esquizofrenia e doença de Huntington (Shaik *et al.*, 2018; Reihaneh *et al.*, 2017; Reddy *et al.*, 2017; Roshan *et al.*, 2014; Goodall *et al.*, 2013; Holohan *et al.*, 2013). O termo miR-29 refere-se a uma família constituída pelo miR-29a, miR-29b e miR-29c. A família do miR-29 tem como alvo o ARNm da β -secretase. Assim sendo, diversos estudos recentes reportaram que a perda ou a diminuição da expressão deste miARN está inversamente correlacionada com a expressão da β -secretase e, consequentemente, com o aumento da formação dos péptidos AB, em casos esporádicos da DA (Idda *et al.*, 2018; Reihaneh *et al.*, 2017; Pereira *et al.*, 2016; Müller *et al.*, 2016; Pereira *et al.*, 2014; Roshan *et al.*, 2014; Hébert *et al.*, 2008).

Relativamente à ação do miR-29 na β -secretase, diversos estudos demonstraram que a sub-expressão do miR-29a/b está relacionada com o aumento da expressão da β -secretase, o que

promove o aumento da clivagem da APP em péptidos A β . Estas evidências salientam o papel crucial da sub-expressão do miR-29 na DA e o seu envolvimento na via amilóide (Idda *et al.*, 2018; Guo *et al.*, 2017; Pereira *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2014; Roshan *et al.*, 2014; Hébert *et al.*, 2008). Como descrito anteriormente, existem alguns trabalhos na literatura que comprovam que os doentes com DA apresentam uma diminuição na expressão do miR-29 e, outros trabalhos demonstraram que com o avançar da idade, indivíduos saudáveis apresentam uma sobre-expressão do miR-29a/b. Assim sendo, este miARN para além de estar envolvido na inibição da expressão da β -secretase, também é importante no envelhecimento cerebral, bem como na modulação da atividade microglial (Femminella *et al.*, 2015; Goodall *et al.*, 2013; Delay *et al.*, 2012).

Para além da ação do miR-29 na β -secretase, foi demonstrado em diversos estudos, que o miR-29b é um fator importante para a manutenção da homeostase neuronal, uma vez que funciona como um inibidor da apoptose neuronal, visto que estas células têm uma capacidade de regeneração limitada (Roshan *et al.*, 2014; Delay *et al.*, 2012). Este fator também é importante para a inibição do desenvolvimento da DA, visto que promove a diminuição da carga neuronal.

Um outro estudo demonstrou que o miR-29c também tem como alvo a β -secretase e que este miARN também se encontra sub-expresso (Reihaneh *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2015; Delay *et al.*, 2012). Nesse estudo ficou também demonstrado que a sobre-expressão do miR-29c seria benéfica, uma vez que promoveu comportamentos de aprendizagem e de memória em ratos (Reihaneh *et al.*, 2017; Reddy *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2015; Roshan *et al.*, 2014). Assim sendo, a família do miR-29 (miR-29a/b/c) encontra-se sub-expressa em indivíduos com DA e atua na regulação da expressão da β -secretase, inibindo os seus níveis proteicos, o que consequentemente levará a uma inibição da produção dos péptidos A β . Consequentemente, uma inibição da expressão dos péptidos A β , levará a uma progressão mais lenta ou mesmo a uma possível cura da DA.

Deste modo, este trabalho tem como finalidade estudar a relação da expressão de diferentes miARNs (pre-miR-9 e pre-miR-29) com a DA, verificando as interações específicas e funções reguladoras da via amilóide, incluindo a regulação da APP, β -secretase e PS1.

2. Objetivo

Diversos estudos têm evidenciado o papel dos microARNs na regulação da expressão gênica, com impacto significativo quer no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas quer de diagnóstico. No grupo de investigação tem sido explorada a possibilidade de produzir pre-miARNs de forma recombinante, avaliando posteriormente a sua ação biológica em modelos *in vitro*. Um dos casos de estudo tem sido a aplicação do pre-miR-29b, com potencial para silenciar a expressão da proteína BACE1, como abordagem inovadora para a terapia da DA.

Contudo, dada a relevância de outros miARNs na DA, pretendeu-se estudar o pre-miR-9, para além do pre-miR-29b, e avaliar também a sua ação conjunta.

Assim, este estudo tem como objetivos específicos:

- Analisar o silenciamento induzido pelo pre-miR-29b na expressão de algumas proteínas da via amilóide, entre as quais, APP, BACE1 e presenilina.
- Analisar o silenciamento realizado pelo pre-miR-9 na expressão de algumas proteínas da via amilóide, entre as quais, APP, BACE1 e presenilina.
- Analisar uma possível sinergia, no silenciamento na expressão de algumas proteínas da via amilóide, como a APP, BACE1 e presenilina, usando em simultâneo o pre-miR-29b e pre-miR-9.

3. Materiais e Métodos

3.1. Materiais

Os reagentes necessários para o crescimento em cultura da bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 α foram: triptona e extrato de levedura adquiridos na empresa Bioakar (Beauvais, França), glicerol da Himedia, hidrogenofosfato de potássio (K₂HPO₄) da Panreac (Barcelona, Espanha) e dihidrogenofosfato de potássio (KH₂PO₄) da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA) para o meio líquido e, “*Luria Broth*” agar da Pronalab (Mérida, Iucatã, México) para o meio sólido. Ambos os meios de cultura foram suplementados com o antibiótico canamicina, da Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, EUA). Para a extração de ADN plasmídico (ADNp) a partir de células procariotas, utilizou-se o kit comercial NZYMiniprep da NZYTech *Genes and Enzymes* (Lisboa, Portugal). Na realização da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) foram utilizados os seguintes reagentes: Taq DNA Polimerase e MgCl₂ da NZYTech (Lisboa, Portugal), *primer Forward* (Fw) e *primer Reverse* (Rv) da STABvida (Lisboa, Portugal) (Tabela 5). Para a purificação dos produtos de PCR utilizou-se o kit “*NucleoSpin[®] Gel and PCR Clear-up*” da Machery-Nagel (Düren, Alemanha). Na realização da transcrição *in vitro*, os reagentes necessários foram: tampão de reação 10x, ribonucleotídeos trifosfato (*rNTP's*), T7 *Enzyme Mix*, desoxiribonuclease I (DNase I) e ácido etilenodiamino-tetracético (EDTA), adquiridos na Invitrogen (Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, EUA)). Nos ensaios *in vitro* utilizou-se uma linha celular de neuroblastoma de rato (N2a) transfectada com ADN complementar (ADNc) que codifica a proteína humana APP₆₉₅ (N2a695) gentilmente cedida pelo Professor Wenjie Luo (Weill Cornell Medical College). Para a cultura celular da linha N2a695 foram necessários os seguintes reagentes: “*Dulbecco's Modified Eagles's Medium*” (DMEM) da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA), OptiMEM e soro fetal bovino (FBS) da Gibco, Life Technologies (EUA) e penicilina-streptomomicina da Grisp (Porto, Portugal). Durante os ensaios de transfeção da linha celular N2a695, foram usados os seguintes reagentes para a preparação das nanopartículas: tampão acetato (acetato de sódio, ácido acético glacial, água Milli-Q), a pH=4,5 e quitosano (CS) da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA). Os reagentes utilizados na extração de ARN de células eucariotas foram TripleXtractor (TRIzol) da Grisp (Porto, Portugal), tampão *phosphate-buffered saline* (PBS), a pH=7,5 (137mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1 mM KH₂PO₄), clorofórmio da Fisher Scientific (Inglaterra), isopropanol da Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, EUA) e etanol 75%. Todas as soluções utilizadas para a extração de ARN foram previamente preparadas com água Milli-Q (água desionizada ultra-pura, purificada com o sistema Milli-Q da Milipore (Billerica, MA, EUA)) tratada com 0,01% de dietilpirocarbonato (DEPC) da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA). Para a realização da síntese ADNc, os reagentes utilizados foram: *random primers*, tampão, desoxirribonucleotídeos trifosfato (*dNTP's*), *RiboLock RNase Inhibitor*, transcriptase reversa do kit “*cDNA RevertAid First Strand*” da Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, EUA). Na realização da técnica de PCR em tempo real (RT-qPCR) foram utilizados: SyBrGreen, do kit Maxima[®] SYBR Green/Fluoresceína qPCR Master Mix da Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, EUA), *primer Fw* e *primer Rv* da STABvida, respetivo de cada ARNm em estudo

(Tabela 6). O material utilizado nos diversos procedimentos experimentais foi previamente autoclavado. Para a realização da electroforese em gel de agarose 1% foi usada a agarose e Green-Safe da Grisp (Porto, Portugal) e tampão TAE (40 mM Tris-Base, 20 mM ácido acético e 1 mM EDTA), a pH=8,0. Para a realização da imunocitoquímica, os reagentes utilizados foram tampão PBS, a pH=7,5, tampão PBS-T (*Phosphate Buffered Saline Tween* 0,1%), PBS + Triton X-100 0,1%, PBS-T + 20% FBS, *DAPI*, PBS-T + 1% FBS, *Dako* e os respetivos anticorpos primários e secundários (Tabela 7). Para a realização da extração proteica das células eucariotas recorreu-se aos seguintes reagentes: tampão PBS, a pH=7,5, tampão de lise completo (25 mM Tris-HCl, 2,5 mM EDTA, 2,5 mM ácido etileno glicol-tetracético (EGTA), 1% Triton X-100, 25 mM fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA) e cocktail de inibidores de proteases da Roche. Para a realização da técnica de *western blotting*, os reagentes utilizados foram: tampão de redução (glicerol, SDS 10%, Tris-HCl a 1,25 M, pH=6,8 e azul de bromofenol), β -mercaptoetanol da Merck (Whitehouse Station, EUA), poliácridamida da Grisp (Porto, Portugal), Tris-HCl a 1,875 M, a pH=8,8, Tris-HCl a 1,25 M, a pH=6,8, persulfato de amónio (PSA), tetrametiletlenodiamina (TEMED) da Thermo Fisher Scientific (Geel, Bélgica), tampão de electroforese (TGS: Tris-Base, glicina, SDS), membrana de *polyvinilidene difluoride* (PVDF) de 0,45 μ m da GE Healthcare, Life Sciences (Alemanha), tampão de transferência (25 mM Tris-Base, 192 mM glicina e 20% metanol puro), metanol puro da Fisher Scientific (Inglaterra), papel de filtro *Whatman*, tampão TBS (Tris-Buffered Saline: 20 mM Tris-HCl, a pH=7,6 e 137 mM NaCl), tampão TBS-T (Tris-Buffered Saline - Tween: 20 mM Tris-HCl, a pH=7,6; 137 mM NaCl e Tween-20), albumina sérica bovina (BSA) da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA) e os respetivos anticorpos (Tabela 8).

3.2. Métodos

3.2.1. Condições de crescimento da bactéria *Escherichia coli* DH5 α

Os vetores de ADNp contendo as sequências humanas dos pre-miARNs em estudo (pre-miR-9 e pre-miR-29b) foram produzidos e replicados a partir de uma cultura celular de *Escherichia coli* DH5 α . O crescimento celular foi iniciado em meio sólido “*Luria Broth*” agar, durante a noite a 37°C e, posteriormente, realizada uma pré-fermentação a uma temperatura de 37°C, com uma agitação de 250 rotações por minuto (rpm), em condições aeróbias num erlenmeyer de 500 mL contendo 125 mL de meio de cultura. O meio utilizado para o crescimento foi “*Terrific Broth*” (TB) (12 g/L de triptona, 24 g/L de extrato de levedura, $5,5 \times 10^{-5}$ de glicerol, 23,14 g/L de KH_2PO_4 e de K_2HPO_4). O crescimento celular foi interrompido quando se atingiu uma densidade óptica (DO) a 600 nm de aproximadamente 2,6, a qual foi medida utilizando o espectrofotómetro Pharmacia Biotech Ultrospec 3000 UV/Visible (Cambridge, Inglaterra). A fermentação foi, posteriormente, iniciada a uma temperatura de 37°C, com uma agitação de 250 rpm, em condições aeróbias em 250 mL de meio de cultura, com uma DO de 0,1, pipetando-se um determinado volume da pré-fermentação, calculado segundo a fórmula:

$$DO_{\text{pré-fermentação}} \times V_{\text{retirar da pré-fermentação}} = (V_{\text{retirar da pré-fermentação}} + V_{\text{fermentação}}) \times DO_{\text{fermentação}}$$

O crescimento celular foi interrompido no final da fase exponencial de crescimento (fase log) ($DO \approx 6,8$). Após o crescimento celular, as células de *E. coli* DH5 α foram recolhidas por centrifugação a 3900 g durante 10 minutos, a uma temperatura de 4°C e, posteriormente, armazenadas a uma temperatura de -20°C (Figura 16).

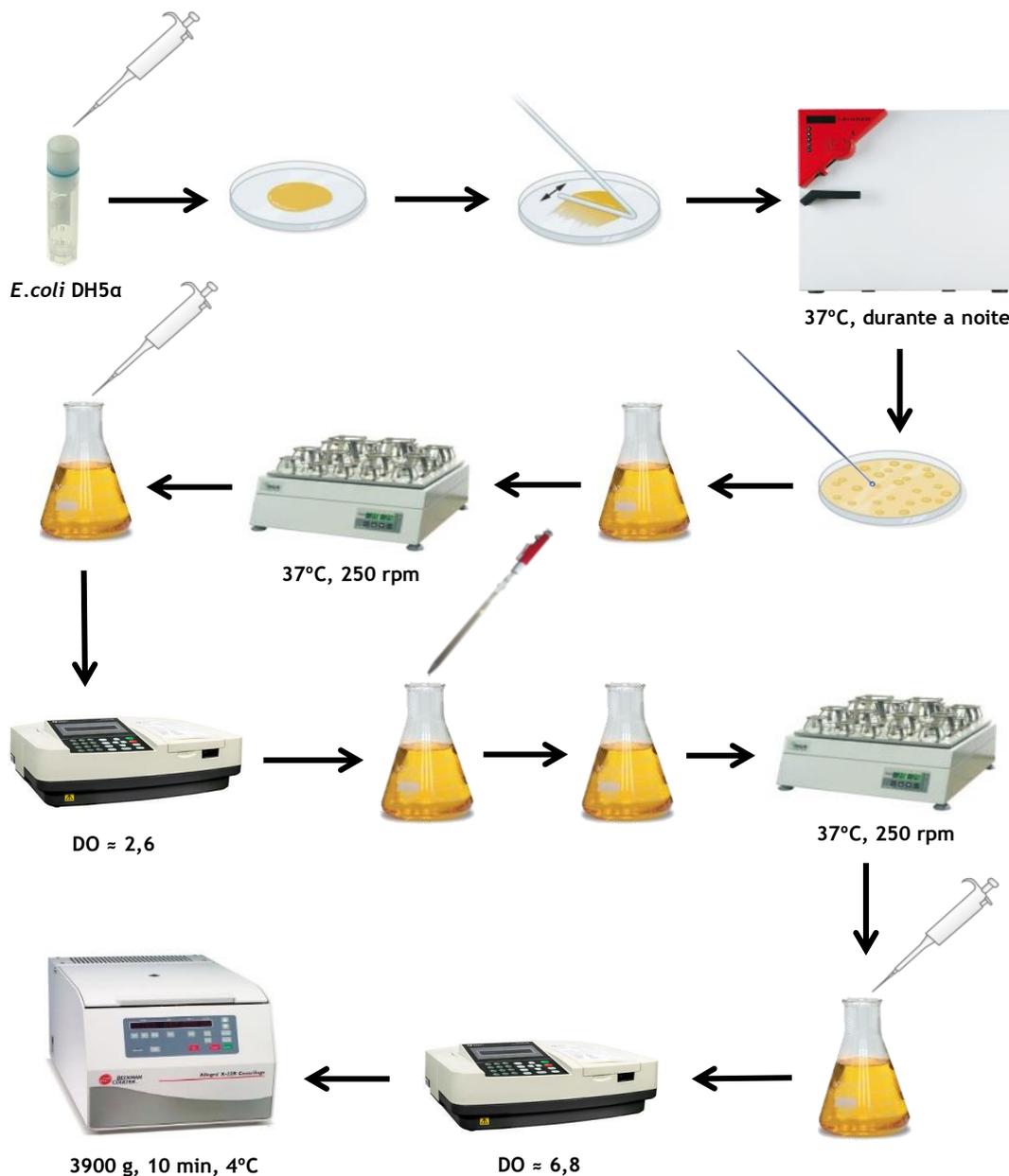


Figura 16. Desenho experimental das condições de crescimento da bactéria *Escherichia coli* DH5 α .

3.2.2. Extração de ADN plasmídico de células *Escherichia coli* DH5 α

A extração de ADNp foi realizada utilizando um kit comercial, NZYMiniprep, de acordo com as recomendações do fabricante. O kit NZYMiniprep permite a obtenção rápida e em pequena escala de ADNp altamente puro, a partir de estirpes de *Escherichia coli* recombinantes. Resumidamente, iniciou-se o processo com uma centrifugação de 30 segundos, à temperatura ambiente, a uma velocidade de 12300 g, para obtenção de um *pellet* celular de 1 mL de células de *E. coli* DH5 α , descartando-se posteriormente o sobrenadante. O *pellet* celular obtido foi ressuscitado em 250 μ L de tampão A1, com o auxílio do vórtex. Posteriormente, adicionou-se 250 μ L de tampão A2, para proceder ao passo de lise, tendo sido realizada uma homogeneização suave. Posteriormente foram ainda adicionados 300 μ L de tampão A3, para neutralizar a solução anterior. Após uma homogeneização suave, o lisado celular foi centrifugado durante 5 a 10 minutos, à temperatura ambiente, a uma velocidade de 12300 g, para clarificação do mesmo. Concluída a centrifugação, transferiu-se o sobrenadante para uma coluna NZYTech com um tubo colector de 2 mL e voltou-se a centrifugar durante 1 minuto, à temperatura ambiente e uma velocidade de 11000 g, promovendo-se assim a ligação do ácido desoxirribonucleico (ADN) à coluna. Após a ligação do ADN, procedeu-se à lavagem da amostra, por adição de 500 μ L de tampão AY e, posterior centrifugação durante 1 minuto, à temperatura ambiente e a uma velocidade de 12300 g. Adicionaram-se 600 μ L de tampão A4 e, voltou-se a centrifugar nas mesmas condições. Após a centrifugação, a coluna NZYTech com o ADN ligado foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL, à qual foi adicionando 50 μ L de tampão AE, deixando-se incubar durante 1 minuto, à temperatura ambiente. Posteriormente, realizou-se uma nova centrifugação durante 1 minuto, à temperatura ambiente e a uma velocidade de 12300 g. Por fim, quantificou-se a concentração de ADN com uso do NanoPhotometer (IMPLEN, Reino Unido), verificando-se também a sua integridade e pureza num gel de agarose 1%, tendo sido a amostra armazenada a -20°C para uso posterior.

3.2.3. Eletroforese em gel de agarose

O ADNp extraído foi analisado por electroforese horizontal em gel de agarose 1% (Hoefer, Holliston, MA, EUA) utilizando Green-Safe (0,012 μ L/mL), como agente intercalante. As amostras foram preparadas com 5 μ L de amostra e 0,5 μ L de *loading buffer* (glicerol, azul de bromofenol, água Milli-Q) e, posteriormente, depositadas no gel. A eletroforese foi realizada com uma voltagem de 110V, durante 40 minutos em tampão TAE. Após a corrida da eletroforese, visualizou-se o gel de agarose numa câmara de ultravioleta (UV) (UVitec Cambridge (Cambridge, Reino Unido)), no qual se adquiriu a imagem.

3.2.4. PCR convencional

A amplificação da sequência dos pre-miARNs (pre-miR-9 e pre-miR-29b) foi realizada através de um PCR. Para tal, utilizou-se a “*Supreme NZYtaq II DNA Polymerase*” (NZYTech, Lisboa, Portugal) e seguiu-se o protocolo recomendado pelo fabricante. Por cada reação, com um volume total de 25 µL adicionou-se 0,3 µL de *primer Fw*, 0,3 µL de *primer Rv* respetivo a cada pre-miARN (STABvida), 1 µL de MgCl₂, 12,5 µL de *Supreme NZYtaq II DNA Polymerase* e, por fim, perfez-se o restante volume com água Milli-Q autoclavada. A escolha dos oligonucleótidos iniciadores (*primers*) foi efetuada através da sequência humana do pre-miR-9 e do pre-miR-29b (Tabela 5). Posteriormente, a cada reação foi adicionado 1 µL de ADNp contendo a sequência dos pre-miARNs, à exceção do controlo negativo, ao qual se adicionou 1 µL de água Milli-Q autoclavada. A amplificação dos pre-miARNs ocorreu num termociclador T100™ *Thermal Cycler* da BioRad. Inicialmente, as amostras foram colocadas a uma temperatura de 95°C durante 5 minutos, de seguida foram expostas a 25 ciclos a uma temperatura de 95°C durante 30 segundos (desnaturação da molécula de ADN), a uma temperatura de 67°C para o pre-miR-9 e 69°C para o pre-miR-29b durante 30 segundos (temperatura ótima de hibridização de cada *primer* à molécula de ADN) e, seguidamente, colocou-se a uma temperatura de 72°C durante 15 segundos (extensão dos *primers*). Por fim, as amostras foram colocadas a 72°C durante 5 minutos. Os produtos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1% na presença de Green-Safe.

Tabela 5. Sequências do pre-miR-9 e pre-miR-29b (obtidos em www.mirbase.org) e *primers* usados para a amplificação.

miARN	Sequência de <i>primers</i> (5' - 3')	Sequência do miARN (5' - 3')	Tamanho do fragmento (pb)	Temperatura de <i>melting</i> (T _m) / °C
Pre-miR-9	<i>Fw</i> - GTTTTTTTAAATACGACTCACTATAG GCGGGGTTGGTTGTTATCTTTGG	GGTTGTTATCTTTGGTTATCTAG CTGTATGAGTGGTGTGGAGTCTT CATAAAGCTAGATAACCGAAAGT	82	67
	<i>Rv</i> - TGGGGTTATTTTTACTTTTCGGTTATC	AAAAATAACCCCA		67
Pre-miR-29b	<i>Fw</i> - GGAAGCTGGTTTCATATGGTG	CTTCTGGAAGCTGGTTTCACATG GTGGCTTAGATTTTTCCATCTTT GTATCTAGCACCATTTGAAATCA	81	69
	<i>Rv</i> - CCCCCAAGAACTGATTC	GTGTTTTAGGAG		69

3.2.5. Purificação dos produtos de PCR

A purificação dos produtos de PCR foi realizada utilizando o kit comercial, “*NucleoSpin® Gel and PCR Clear-up*” da Machery-Nagel (Düren, Alemanha), de acordo com as recomendações do fabricante. Iniciou-se a purificação, transferindo-se todas as reações de PCR para um microtubo de 1,5 mL, ao qual foi posteriormente adicionado 200 µL de tampão NTI por cada 100 µL de produtos de PCR (200 µL tampão NTI:100 µL de produtos de PCR), homogeneizando-se suavemente a solução resultante. Colocaram-se as colunas de purificação em microtubos novos de 1,5 mL e adicionou-se um volume aproximado de 100 µL da mistura (tampão NTI + produtos de PCR) na coluna de purificação, até perfazer cerca de metade da capacidade da coluna de purificação. Seguidamente, realizou-se uma centrifugação durante 1 minuto, à temperatura ambiente e a uma velocidade de 12300g, descartando-se depois o sobrenadante. Repetiu-se este passo até à inexistência da solução (tampão NTI + produtos de PCR). Posteriormente, adicionou-se 700 µL de tampão NT3 na coluna de purificação e centrifugou-se durante 1 minuto, à temperatura ambiente e uma velocidade de 12300 g, descartando-se novamente o sobrenadante. Seguidamente, colocou-se a coluna num novo microtubo de 1,5 mL e adicionou-se 30 µL de tampão NE, colocando-se posteriormente a centrifugar durante 1 minuto, à temperatura ambiente e a uma velocidade de 12300 g. Por último, quantificou-se o ADN purificado com uso do NanoPhotometer, verificando-se também a sua integridade e pureza em gel de agarose 1%, sendo a amostra armazenada a -20°C para uso posterior.

3.2.6. Transcrição *in vitro*

A transcrição *in vitro* tem como objetivo a obtenção de ARN a partir de ADN. Para a realização de cada reação de transcrição *in vitro* com um volume final de 20 µL, adicionaram-se os seguintes reagentes: 2 µL de tampão de reação 10x, 8 µL de *rNTP*'s (2 µL de cada *rNTP*), 0,4 µg de ADN, 2 µL de *T7 Enzyme Mix* e perpez-se o restante volume com água Milli-Q autoclavada. A mistura obtida foi incubada a uma temperatura de 37°C durante 16 horas e imediatamente arrefecida em gelo. Posteriormente, adicionou-se 1 µL de DNase I, seguida de incubação a uma temperatura de 37°C durante 15 minutos, num termociclador T100™ *Thermal Cycler* da BioRad. Por fim, adicionou-se 1 µL de *STOP solution* (EDTA 0,5 M, pH 8) e as amostras foram armazenadas a -80°C.

3.2.7. Cultura de células eucariotas

Para a realização dos estudos de transfeção e avaliação da atividade biológica do pre-miR-9 e pre-miR-29b, foi utilizada a linha celular N2a695. Para o crescimento celular foi utilizado um meio com a seguinte composição: uma mistura (1:1) de DMEM (Sigma-Aldrich) e OptiMEM (Gibco) com adição de suplementos, entre os quais, 5% (m/v) de FBS inativado pelo calor e 1% (m/v) penicilina-streptomomicina. Esta linha celular foi selecionada para o estudo, devido à sua capacidade de promover a expressão de diversas proteínas de interesse, entre as quais, proteína humana APP, BACE1, PS1 e Aβ, permitindo assim uma maior sensibilidade para a detecção de alterações no nível de expressão das mesmas a nível pós-transcricional. As células foram mantidas a uma temperatura de 37°C numa atmosfera humidificada com 5% de CO₂.

3.2.8. Transfeção das células N2a695 com os pre-miARNs para extração de ARN

Para a transfeção das células N2a695 com o pre-miR-9 e o pre-miR-29b, as células foram cultivadas em placas de 12 poços com uma densidade de 5×10^4 células por poço, realizando-se a contagem com uso de Azul de tripano numa diluição de 1:2 numa câmara de Neubauer. As células foram incubadas durante 24 horas a uma temperatura de 37°C e 5% de CO₂, até uma confluência entre 60 a 80% em meio completo, composto por uma mistura (1:1) DMEM (Sigma-Aldrich) e OptiMEM (Gibco) com adição de suplementos: 5% (m/v) de FBS e 1% (m/v) penicilina-streptomomicina. Quando conseguida a confluência pretendida, realizou-se uma mudança de meio completo para meio incompleto, composto por uma mistura (1:1) DMEM (Sigma-Aldrich) e OptiMEM (Gibco) e incubou-se novamente a uma temperatura de 37°C e 5% de CO₂, durante 12 a 16 horas. Durante a incubação, realizou-se o encapsulamento do pre-miR-9 e pre-miR-29b em nanopartículas de CS. Para a preparação das nanopartículas, colocou-se 8 µg de miARN em 400 µL de Tampão acetato, pH=4,5 num microtubo de 1,5 mL. De seguida, num vórtex colocaram-se 100 µL de CS no *ratio* 35, gota a gota, nos 400 µL de pre-miARN + Tampão acetato a pH=4,5, durante 1 minuto. Posteriormente, centrifugou-se a mistura a uma velocidade de 15000 g, durante 20 minutos a uma temperatura de 4°C. Após a centrifugação, ressuspendeu-se o *pellet* formado (nanopartículas de CS com o pre-miARN) em 400 µL de OptiMEM. De seguida, em cada poço, adicionou-se 200 µL de nanopartículas + pre-miARN ressuscitado em OptiMEM (Figura 17), homogeneizando-se muito bem a placa de cultura e colocou-se a incubar a 37°C e 5% de CO₂. Após 4 horas de incubação, a transfeção foi interrompida através da mudança de meio, de meio incompleto para meio a 1%, composto por uma mistura (1:1) DMEM (Sigma-Aldrich) e OptiMEM (Gibco) com adição de suplementos: 1% (m/v) de FBS e 1% (m/v) de penicilina-streptomomicina e, posteriormente, a placa foi incubada a uma temperatura de 37°C e 5% de CO₂ durante 72 horas.

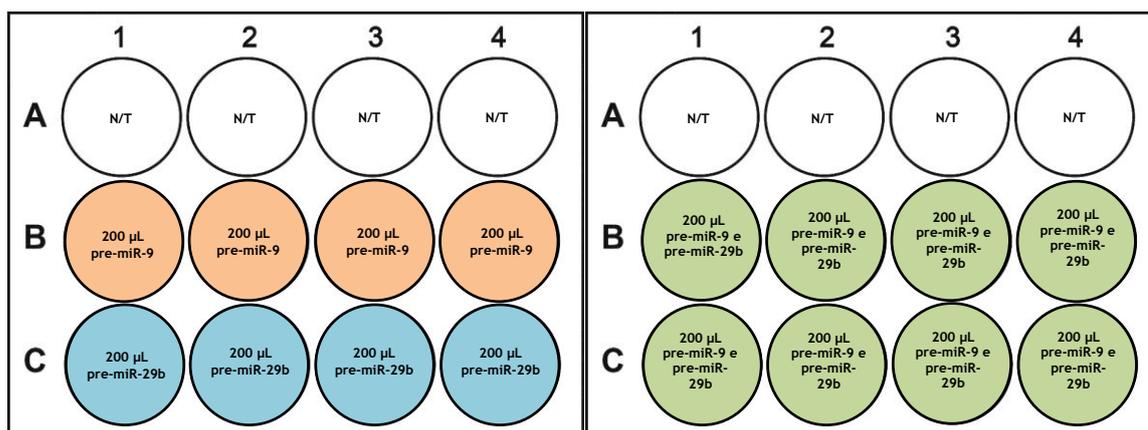


Figura 17. Desenho experimental da transfeção das células N2a695 com o pre-miR-9 e pre-miR-29b individualmente e em simultâneo numa placa de 12 poços. N/T - Células não transfetadas; 200 µL pre-miR-9 - Células transfetadas com 200 µL de uma mistura de quitosano + 8 µg de pre-miR-9; 200 µL pre-miR-29b - Células transfetadas com 200 µL de uma mistura de quitosano + 8 µg de pre-miR-29b; 200 µL pre-miR-9 e pre-miR-29b - Células transfetadas com 200 µL de uma mistura de quitosano + 8 µg de pre-miR-9 e 200 µL de uma mistura de quitosano + 8 µg pre-miR-29b.

3.2.9. Extração de ARN Total de células eucariotas

O ARN é um ácido nucleico de cadeia simples extremamente lábil, pelo que, todo o procedimento de extração foi realizado em gelo. A dificuldade de obtenção de moléculas de ARN puras e íntegras provém principalmente da degradação enzimática por ribonucleases (RNases). Assim, utilizaram-se agentes desnaturantes fortes, que efetuam a lise celular e inativam as RNases, e água tratada com DEPC, que inativa as RNases. A extração de ARN Total foi realizada utilizando o reagente TRIzol, de acordo com as recomendações do fabricante. Assim, para a extração do ARN Total das células eucariotas, iniciou-se a lavagem dos poços contendo as células transfetadas com PBS (1x), com posterior adição de 300 µL de reagente TRIzol, o qual consiste numa solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina. Após adição do reagente TRIzol efetuaram-se repetidas homogeneizações *up and down* com o auxílio de uma micropipeta, permitindo assim a lise celular e a dissolução dos vários componentes celulares. De seguida, transferiu-se o lisado celular com TRIzol para microtubos de 1,5 mL e incubou-se durante 5 minutos à temperatura ambiente, o que permitiu uma completa dissociação dos complexos nucleoproteicos. Depois, adicionou-se 60 µL de clorofórmio, numa razão de 200 µL de clorofórmio para 1 mL de TRIzol e homogeneizou-se vigorosamente. Após a homogeneização, incubou-se a mistura durante 10 minutos à temperatura ambiente, com posterior centrifugação durante 15 minutos, a uma temperatura 4°C e uma velocidade de 12000 g. Depois da centrifugação, a mistura apresenta três fases, na qual a fase inferior, a fase orgânica (cor rosa) contém resíduos de fenol, clorofórmio, proteínas e lípidos, a interfase, onde se encontra o ADN (cor esbranquiçada) e, por fim, a fase superior, fase aquosa (transparente), onde se encontra o ARN. Como a molécula de interesse é o ARN, a fase aquosa foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL ao qual se adicionou ~200 µL de isopropanol gelado através de uma homogeneização suave, por inversão, para

posterior recuperação do ARN por precipitação. Seguidamente, incubou-se a mistura resultante em gelo durante 15 minutos e, por fim, centrifugou-se durante 10 minutos, a uma temperatura de 4°C e velocidade de 12000 g, descartando-se o sobrenadante. O *pellet* de ARN foi, posteriormente, lavado com 200 µL de etanol 75% em água tratada com DEPC e centrifugado durante 5 minutos, a uma temperatura de 4°C e uma velocidade de 12000 g. O sobrenadante foi novamente descartado e o *pellet* de ARN foi seco à temperatura ambiente. Por último, o *pellet* de ARN Total foi re-hidratado em 20 µL de água Milli-Q tratada com DEPC (Figura 18), quantificando-se a concentração de ARN com uso do NanoPhotometer, verificando-se também a sua integridade e pureza em gel de agarose 1%. A qualidade/integridade do ARN foi confirmada pela presença de 2 bandas de ARN ribossomal (ARNr), 18S e 28S, onde a banda 28S deve apresentar aproximadamente o dobro da intensidade da 18S. As amostras foram posteriormente armazenadas a -80°C para uso posterior.

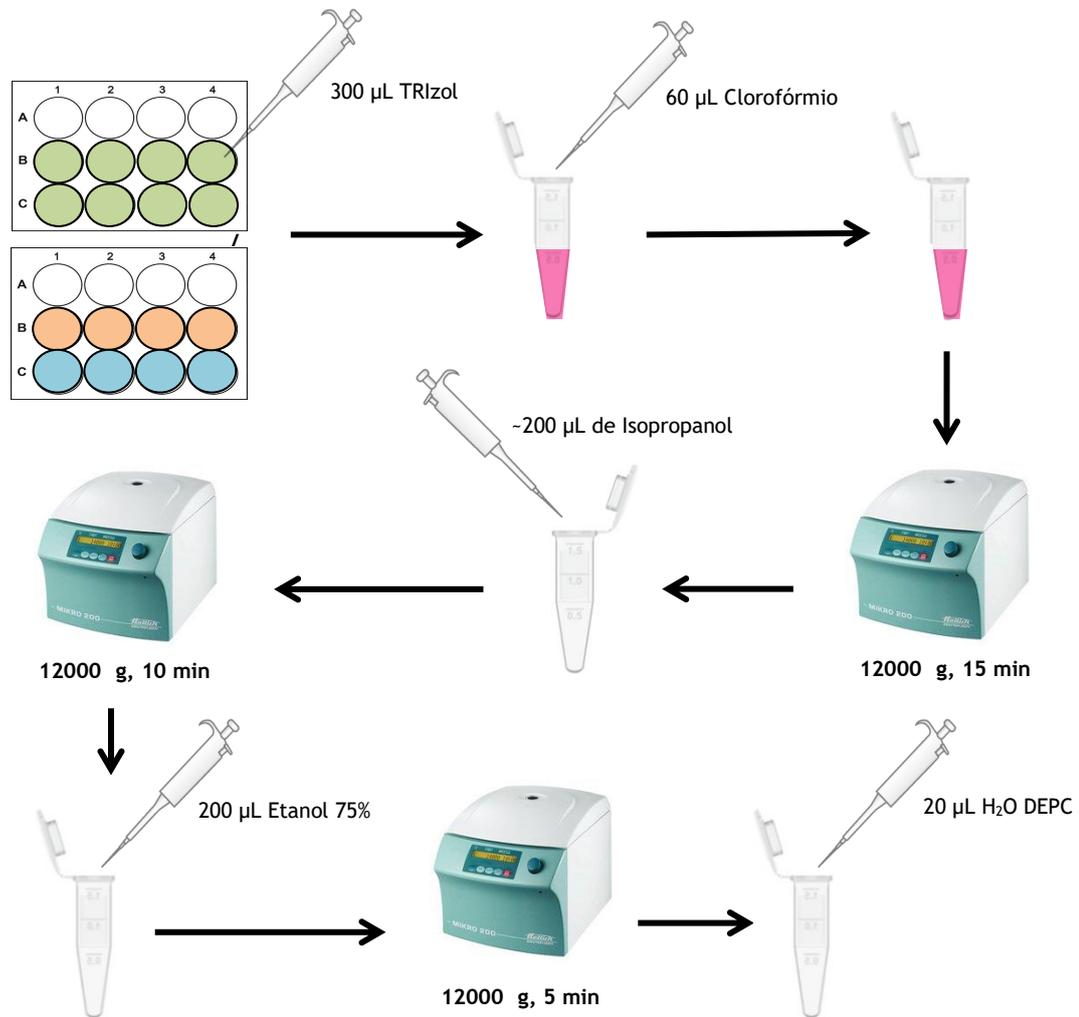


Figura 18. Desenho experimental da extração de ARN Total de células eucariotas numa placa de 12 poços.

3.2.10. Quantificação do ARN Total

A quantificação do ARN total foi realizada por espectrofotometria, utilizando um NanoPhotometer, por medição das absorvâncias a 260 (A_{260}) e 280 nm (A_{280}). Este aparelho permite a leitura direta da concentração de ARN Total ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$), através da medição da absorvância a 260 nm ($A_{260} = \epsilon bc$, no qual se aplica a Lei da Lambert Beer, sendo $\epsilon = 25\text{cm}^{-1} \text{mg}^{-1}\text{mL}^{-1}$) e do grau de pureza através do ratio entre a A_{260}/A_{280} . O grau de pureza do ARN Total é indicado com base na absorvância a A_{260} , comprimento de onda no qual os ácidos nucleicos apresentam o pico máximo de absorção e a A_{280} , comprimento de onda no qual as proteínas apresentam o pico máximo de absorção. Assim, para determinação de uma boa integridade e pureza do ARN Total, o ratio em causa deverá registar-se num intervalo entre 1,9 a 2,1.

3.2.11. Síntese de ADN complementar

ADN complementar é um ADN sintetizado a partir da transcrição reversa do ARN Total, através da ação da enzima transcriptase reversa. A síntese de ADNc foi realizada utilizando o Kit “*cdNA RevertAid First Strand*” (Thermo Fisher Scientific Inc.), de acordo com as instruções do fabricante. Para cada reação de síntese de ADNc de volume final de 20 μL , adicionou-se um volume adequado para 1 μg de ARN Total, 1 μL de *Random primers* e fez-se o restante volume com água Milli-Q autoclavada. Realizou-se uma homogeneização suave, através de movimentos *up and down*, com o auxílio de uma micropipeta. Esta mistura foi incubada a uma temperatura de 65°C durante 5 minutos e imediatamente arrefecida em gelo. Posteriormente, adicionaram-se os seguintes reagentes: 4 μL de tampão 5x, 2 μL de dNTP's (10 mM), 1 μL de *RiboLock RNase Inhibitor* (20 U/ μL) e 1 μL de *RevertAid M-MuLV RT* (transcriptase reversa) (200 U/ μL). Por fim, realizou-se novamente uma homogeneização suave, através de movimentos *up and down*. Seguiu-se uma incubação a 25°C durante 5 minutos. Após os 5 minutos variou-se a temperatura para 42°C durante 60 minutos. Por fim, as amostras de ADNc foram incubadas a 70°C durante 5 minutos, num termociclador T100™ *Thermal Cycler* da BioRad e armazenaram-se a -20°C.

3.2.12. PCR quantitativo em tempo real

Para verificar se os pre-miARNs sintetizados por transcrição *in vitro* tinham atividade biológica na inibição dos níveis de expressão dos ARNm alvos realizou-se RT-qPCR. Cada reação de RT-qPCR continha 6,6 μL de água Milli-Q autoclavada, 1,2 μL de *primer Fw*, 1,2 μL de *primer Rv* respetivo a cada ARNm em estudo (Tabela 6), 10 μL de *SyBrGreen*, para um volume final de 19 μL . A cada reação foi adicionado 1 μL de ADNc, à exceção do controlo negativo, ao qual não se adicionou o ADNc. A amplificação dos genes de interesse ocorreu num sistema de real time *CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System*, da BioRad. Inicialmente, as amostras foram colocadas a uma temperatura de 95°C, durante 3 minutos. De seguida estas foram expostas a 39 ciclos a uma temperatura de 95°C, durante 30 segundos, para desnaturação da molécula de ADN. Colocou-se posteriormente a uma temperatura ótima

de hibridização de cada *primer* à molécula de ADN (62°C) durante 30 segundos. De seguida, colocou-se a uma temperatura de 72°C, durante 30 segundos, para ocorrer extensão dos *primers*. Por fim, as amostras foram colocadas a uma temperatura de 65°C durante 5 segundos, com um incremento de 0,5°C até a uma temperatura de 95°C para a realização das curvas de *melting*, verificando assim se existiam ligações/amplificações inespecíficas.

Tabela 6. *Primers* utilizados no RT-qPCR dos ADNc dos genes em estudo.

ADNc	Sequência do <i>primer Fw</i> (5' - 3')	Sequência do <i>primer Rv</i> (5' - 3')	Temperatura de <i>melting</i> (T _m) / °C
BACE1	AGACGCTCAACATCCTGGTG	CCTGGGTGTAGGGCACATAC	62
APP	AGAGGTCTACCCTGAACTGC	ATCGCTTACAAACTCACCAAC	62
PS1	GAGGAAGACGAAGAGCTGACA	GAAGCTGACTGACTTGATGGT	62
GAPDH	TGACGTGCCGCTGGAGAAA	AGTGTAGCCCAAGATGCCCTTCAG	62

3.2.13. Transfeção das células N2a695 com os pre-miARNs para imunocitoquímica

Para a transfeção das células N2a695 com o pre-miR-9 e o pre-miR-29b, com o objetivo de realizar imunocitoquímica, as células foram cultivadas em placas de 24 poços, no qual se colocou uma lamela por cada poço. Adicionou-se uma densidade de $2,5 \times 10^4$ células por poço, realizando-se a contagem com uso de Azul de tripano numa diluição de 1:2 numa câmara de Neubauer. As células foram incubadas durante 24 horas a uma temperatura de 37°C e 5% de CO₂, até uma confluência entre 60 a 80% em meio completo, composto por uma mistura (1:1) DMEM (Sigma-Aldrich) e OptiMEM (Gibco) com adição de suplementos: 5% (m/v) de FBS e 1% (m/v) de penicilina-streptomomicina. Quando conseguida a confluência pretendida, realizou-se uma mudança de meio completo para meio incompleto, composto por uma mistura (1:1) DMEM (Sigma-Aldrich) e OptiMEM (Gibco) e incubou-se novamente a uma temperatura de 37°C e 5% de CO₂, durante 12 a 16 horas. Em paralelo à incubação, realizou-se a encapsulação do pre-miR-9 e pre-miR-29b em nanopartículas de CS. Para a preparação das nanopartículas, colocou-se 8 µg de miARN em 400 µL de Tampão acetato, pH=4,5 num microtubo de 1,5 mL. De seguida, num vórtex colocaram-se 100 µL de CS no *ratio* 35, gota a gota, nos 400 µL de pre-miARN + Tampão acetato a pH=4,5, durante 1 minuto. Posteriormente, centrifugou-se a mistura a uma velocidade de 15000 g, durante 20 minutos a uma temperatura de 4°C. Após a centrifugação, ressuspendeu-se o *pellet* formado (nanopartículas de CS com o pre-miARN) em 400 µL de OptiMEM. De seguida, adicionou-se 100

μL de nanopartículas + pre-miARN ressuspendido em OptiMEM em cada poço (Figura 19), homogeneizando-se muito bem a placa de cultura e colocou-se a incubar a 37°C e 5% de CO_2 . Após 4 horas de incubação, parou-se a transfeção através da mudança de meio, de meio incompleto para meio a 1%, composto por uma mistura (1:1) DMEM (Sigma-Aldrich) e OptiMEM (Gibco) com adição de suplementos: 1% (m/v) de FBS e 1% (m/v) de penicilina-streptomina e, posteriormente a placa foi incubada a uma temperatura de 37°C e 5% de CO_2 durante 72 horas.

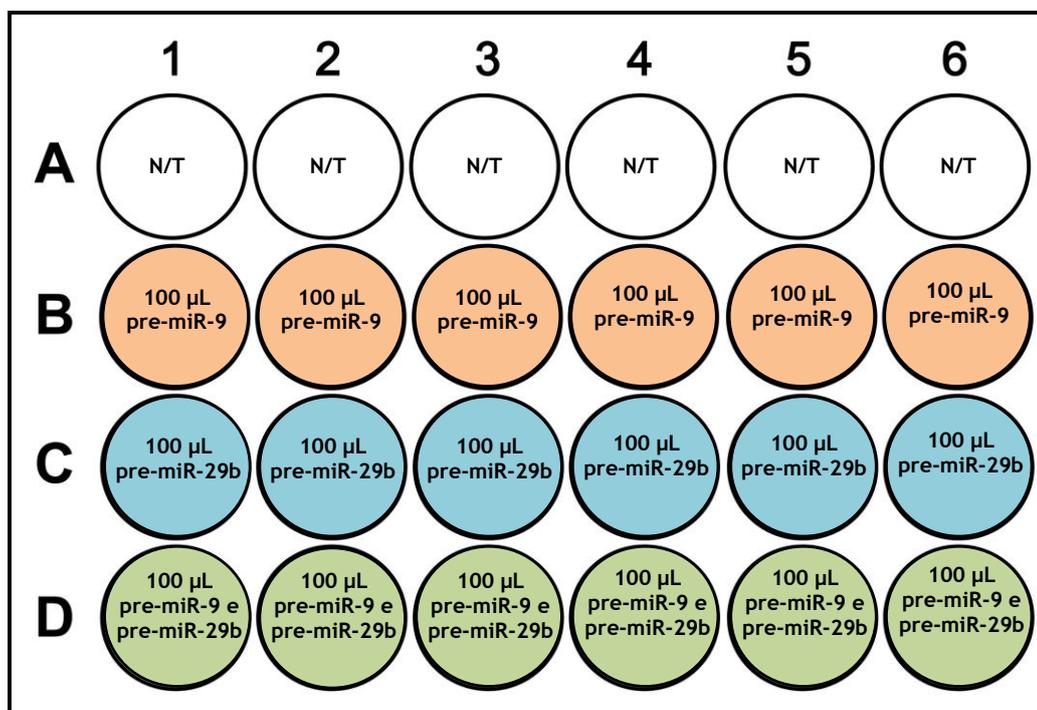


Figura 19. Desenho experimental da transfeção das células N2a695 com o pre-miR-9 e pre-miR-29b individualmente e em simultâneo numa placa de 24 poços. N/T - Células não transfetadas; 100 μL pre-miR-9 - Células transfetadas com 100 μL de uma mistura de quitosano + 8 μg de pre-miR-9; 100 μL pre-miR-29b - Células transfetadas com 100 μL de uma mistura de quitosano + 8 μg de pre-miR-29b; 100 μL pre-miR-9 e pre-miR-29b - Células transfetadas com 200 μL de uma mistura de quitosano + 8 μg de pre-miR-9 e 200 μL de uma mistura de quitosano + 8 μg pre-miR-29b.

3.2.14. Imunocitoquímica

A técnica de imunocitoquímica permite avaliar a expressão de proteínas, assim como, conhecer a sua localização e distribuição celular. Como referido as células N2a695 foram cultivadas numa placa contendo uma lamela por poço, e incubadas a 37°C + 5% CO_2 . Posteriormente, lavaram-se as lamelas, uma vez, com PBS 1x e fixaram-se as células com PFA 4% durante 10 minutos à temperatura ambiente. Após a fixação, lavaram-se novamente as lamelas, duas vezes, com PBS 1x. De forma a permeabilizar as membranas das células, as células foram incubadas durante 15 minutos numa solução de PBS + Triton X-100 0,1%. As células após a permeabilização foram novamente lavadas com PBS 1x, este passo foi repetido duas vezes. De forma a bloquear a atividade das peroxidases endógenas, realizou-se o bloqueio com uma solução de PBS-T (*Phosphate Buffered Saline Tween* 0,1%) + 20% FBS

durante 1 hora. As lamelas foram então transferidas dos poços para a tampa da placa após três lavagens com PBS-T. Seguidamente, incubaram-se durante a noite, a 4°C, com o respetivo anticorpo primário (Tabela 7), diluído em solução de diluição de anticorpos (PBS-T + 1% FBS). Após este período de incubação, as células foram lavadas seis vezes com PBS-T e incubadas com o anticorpo secundário durante 1 hora à temperatura ambiente e num ambiente escuro. Posteriormente, procedeu-se à marcação do núcleo utilizando *DAPI* (1:1000) durante 10 minutos, à temperatura ambiente e num ambiente escuro. Por fim, procedeu-se à montagem das lâminas utilizando meio de montagem (Dako) e à sua selagem com verniz. Observaram-se as lamelas no microscópio confocal (Carl Zeiss SMT Inc., USA) e usou-se o laser Zeiss LSM 710, numa objetiva de 63x.

Tabela 7. Anticorpos utilizados para as proteínas em estudo em imunocitoquímica.

Proteína	Anticorpo primário	Diluição	Marca comercial	Anticorpo secundário	Diluição	Marca comercial
BACE1	<i>Anti-BACE1 antibody (ab2077)</i>	1:100	Abcam (Cambridge, Inglaterra)	<i>AlexaFluor 488[®] goat anti-rabbit</i>	1:1000	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, EUA)
	<i>Anti-Presenilin 1 antibody [APS 18]</i>	1:100	Abcam (Cambridge, Inglaterra)	<i>AlexaFluor 546[®] goat anti-mouse</i>		

Por cada experiência, foram sempre realizados triplicados e três controlos negativos, um para verificar a especificidade do anticorpo primário, no qual este foi omitido, outro para analisar a possível autofluorescência das células, no qual foram omitidos ambos os anticorpos primário e secundário e por fim um controlo com células não transfectadas.

3.2.15. Transfecção das células N2a695 com os pre-miARNs para extração proteica

Para a transfecção das células N2a695 com o pre-miR-9 e pre-miR-29b com o intuito de extrair e analisar os níveis de expressão proteica, as células foram cultivadas em placas de 6 poços com uma densidade de 1×10^5 células por poço. As células foram incubadas durante 24 horas a uma temperatura de 37°C e 5% de CO₂, até uma confluência entre 60 a 80% em meio completo, composto por uma mistura (1:1) de DMEM (Sigma-Aldrich) e OptiMEM (Gibco) com adição de suplementos: 5% (m/v) de FBS e 1% (m/v) de penicilina-streptomomicina. Quando conseguida a confluência pretendida, realizou-se uma mudança de meio completo para meio

incompleto, composto por uma mistura (1:1) de DMEM (Sigma-Aldrich) e OptiMEM (Gibco) e incubou-se novamente a uma temperatura de 37°C e 5% de CO₂, durante 12 a 16 horas. Em paralelo à incubação, realizou-se a encapsulação do pre-miR-9 e do pre-miR-29b em nanopartículas de CS. Para a formulação das nanopartículas, colocou-se 8 µg de miARN em 400 µL de Tampão acetato, pH=4,5 num microtubo de 1,5 mL. De seguida, num vórtex colocaram-se 100 µL de CS no *ratio* 35, gota a gota, nos 400 µL de miARN + Tampão acetato a pH=4,5, durante 1 minuto. Posteriormente, centrifugou-se a mistura a uma velocidade de 15000 g, durante 20 minutos a uma temperatura de 4°C. Após a centrifugação, ressuspendeu-se o *pellet* formado (nanopartículas de CS com o pre-miARN) em 400 µL de OptiMEM. De seguida, adicionou-se 400 µL de nanopartículas + pre-miARN ressuspendido em OptiMEM em cada poço (Figura 20), homogeneizando-se muito bem a placa de cultura e colocou-se a incubar a 37°C e 5% de CO₂. Após 4 horas de incubação, a transfeção foi interrompida através da mudança de meio, de meio incompleto para meio a 1%, composto por uma mistura (1:1) de DMEM (Sigma-Aldrich) e OptiMEM (Gibco) com adição de suplementos: 1% (m/v) de FBS e 1% (m/v) de penicilina-streptomicina e, posteriormente a placa foi novamente incubada a uma temperatura de 37°C e 5% de CO₂ durante 72 horas.

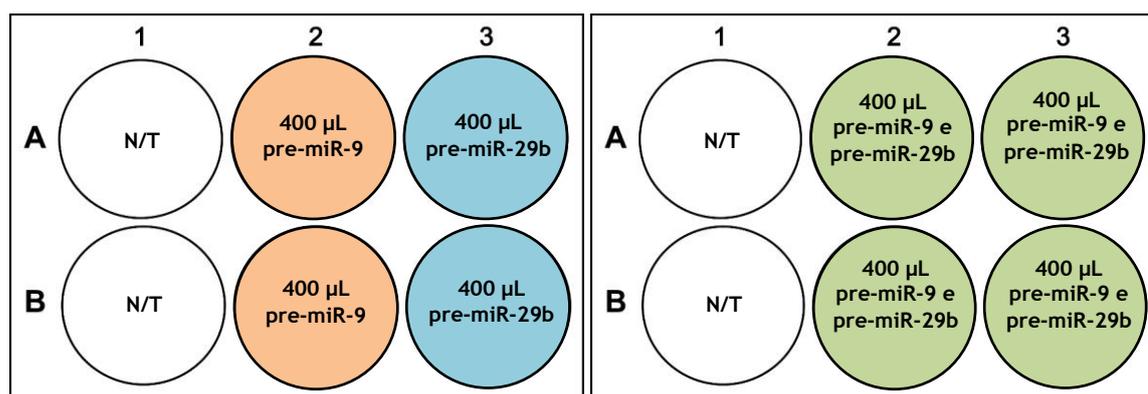


Figura 20. Desenho experimental da transfeção das células N2a695 com o pre-miR-9 e pre-miR-29b individualmente e em simultâneo numa placa de 6 poços. N/T - Células não transfectadas; 400 µL pre-miR-9 - Células transfectadas com 400 µL de uma mistura de quitosano + 8 µg de pre-miR-9; 400 µL pre-miR-29b - Células transfectadas com 400 µL de uma mistura de quitosano + 8 µg de pre-miR-29b; 400 µL pre-miR-9 e pre-miR-29b - Células transfectadas com 400 µL de uma mistura de quitosano + 8 µg de pre-miR-9 e 400 µL de uma mistura de quitosano + 8 µg pre-miR-29b.

3.2.16. Extração proteica

Após realizada a transfeção como mencionado anteriormente, o meio foi descartado e as células lavadas e ressuspensas em tampão PBS, a pH=7,5, e centrifugadas a 11000 g durante 7 minutos, removendo-se o sobrenadante. Este passo foi repetido até um máximo de 3 vezes. O *pellet* celular foi ressuspensado num volume entre 50 a 100 μL de tampão de lise completo. Após a adição do tampão de lise, as alíquotas foram armazenadas a -80°C .

3.2.17. Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas foi realizada pelo método de Bradford. Este é um ensaio colorimétrico simples para determinação da concentração total de proteína e é baseado no método de ligação de corante de Bradford (Azul Brilhante de Coomassie G-250), a uma proteína desconhecida, mais concretamente, a resíduos de aminoácidos e às suas bases aromáticas. Para tal, realizou-se em triplicado a preparação das amostras para posterior leitura da absorvância. Para a preparação das amostras, adicionou-se 1 μL de amostra, 159 μL de água Milli-Q e seguidamente 40 μL do reagente “*Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate*” da BioRad (EUA). Posteriormente, realizou-se a leitura das absorvâncias num comprimento de onda de 595 nm, sendo a quantificação proteica obtida com base numa reta padrão construída com diferentes concentrações conhecidas (0, 0,2, 0,5 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de BSA.

3.2.18. Western Blotting

Western Blotting é uma técnica que permite a deteção de uma proteína específica, a partir de um extrato proteico complexo. Para tal, é necessário a realização de uma eletroforese em gel de poliacrilamida e de dodecil sulfato de sódio (*SDS-PAGE*), na presença de um agente redutor (β -mercaptoetanol) de modo a separar proteínas de acordo com o seu peso molecular. Posteriormente, realiza-se a transferência das proteínas do gel para uma membrana de PVDF, de modo a ser possível a deteção e identificação da proteína de interesse, utilizando anticorpos específicos para as proteínas alvo. Assim, após a transferência, a membrana é exposta a anticorpos específicos e, em seguida, é detetada a presença da proteína por fluorescência.

3.2.18.1. SDS-PAGE

As amostras para o *SDS-PAGE* foram preparadas com uma quantidade de 70 μg de proteína, às quais se adicionou um certo volume de água Milli-Q de modo a obter-se 15 μL de volume final. Posteriormente, adicionou-se 3 μL de tampão de redução + β -mercaptoetanol às amostras preparadas. Seguidamente, colocaram-se as amostras a 95°C durante 10 minutos para a sua desnaturação completa.

Após a preparação das amostras proteicas pretende-se que estas sejam separadas de acordo com o seu peso molecular por *SDS-PAGE*. Foram preparadas eletroforeses em géis desnaturantes de SDS a diferentes percentagens de acrilamida de modo a concentrar a amostra (gel de concentração) e posteriormente promover a sua resolução (gel de resolução), separando as proteínas pelo seu peso molecular. Para preparar o gel de resolução utilizou-se 15% de acrilamida, no qual se adicionou 5 mL de tampão Tris-HCl 1,875 M, a pH=8,8, 250 µL de SDS a 10%, 4,6 mL de água Milli-Q, 10 mL de acrilamida. Adicionou-se posteriormente 200 µL de PSA e 50 µL de TEMED, para polimerização do gel. O gel de concentração foi preparado do mesmo modo que o de resolução, no entanto com 4% de acrilamida, no qual se adicionou 1,25 mL de tampão Tris 1,25 M, a pH=6,8, 1,2 mL de SDS a 10%, 6,7 mL de água Milli-Q, 1,25 mL de acrilamida e posteriormente 200 µL de PSA e 50 µL de TEMED. As amostras foram carregadas nos poços do gel de concentração, bem como o marcador de peso molecular (3 µL), e submetidas a uma voltagem inicial de 90 V durante 15 minutos e, posteriormente, a 130V, aproximadamente durante 120 minutos em tampão de electroforese, constituída por uma diluição de 1:10 da solução stock de TGS.

3.2.18.2. Eletrotransferência

Procedeu-se à eletrotransferência das proteínas do gel de resolução para uma membrana de PVDF recorrendo a um sistema Trans-Blot[®] Cell da BioRad, para a proteína APP, presenilina e BACE1. Finalizada a eletroforese, realizou-se a separação do gel de resolução, do gel de concentração e colocou-se o gel de resolução em Tampão de eletrotransferência durante 15 minutos. Colocou-se também a membrana em metanol puro, durante 5 minutos, para a sua ativação. Posteriormente à ativação da membrana procedeu-se à sua lavagem, durante 10 minutos em água Milli-Q. Procedeu-se, em seguida, à montagem da *sandwich* para a transferência, evitando a formação de bolhas, colocando, de baixo para cima, 4 pedaços de papel de filtro Whatman embebidos em Tampão de eletrotransferência. Posteriormente, colocou-se o gel de migração, a membrana de PVDF e, por fim, 4 pedaços de papel de filtro Whatman embebidos novamente em Tampão de eletrotransferência. Entre cada passo da montagem da *sandwich*, com auxílio de um rolo, removeu-se qualquer eventual bolha de ar, formada durante o processo. A electrotransferência das proteínas decorreu durante 90 minutos a uma voltagem de 125V e 0,75A. Após a eletrotransferência, a membrana foi colocada numa solução de BSA a 5% sob agitação, à temperatura ambiente, durante 1 hora para o bloqueio da mesma.

3.2.18.3. Imunodeteção de proteínas

Após o bloqueio da membrana com BSA, de modo a evitar posteriores ligações inespecíficas dos anticorpos à membrana, incubou-se a membrana com o anticorpo primário (Tabela 8) *overnight* a uma temperatura de 4°C. De seguida, a membrana foi lavada três vezes em intervalos de 15 minutos com TBS-T, antes de se incubar com o anticorpo secundário durante 1 hora à temperatura ambiente. Tanto o anticorpo primário como o secundário foram preparados em TBS-T. No fim da incubação com o anticorpo secundário (Tabela 8), a membrana foi novamente lavada três vezes em intervalos de 15 minutos numa solução de lavagem constituída por uma diluição de 1:10 de TBS stock com a adição de 0,1% de Tween 20. As bandas imunorreativas foram visualizadas com ECF, no qual se utilizou 1 mL. As membranas foram colocadas a incubar no ECF durante 5 minutos. De seguida, foram reveladas no sistema *Molecular Imager FX Pro Plus* (BioRad).

Tabela 8. Anticorpos utilizados para as proteínas em estudo em *western blot*.

Proteína	Anticorpo primário	Diluição	Marca comercial	Anticorpo secundário	Diluição	Marca comercial
PS1	Anti- <i>Presenilin</i> 1 antibody [APS 18]	1:250	Abcam (Cambridge, Inglaterra)	Anticorpo secundário para <i>western blotting</i> reagent pack, Mouse	1:20000	Santa Cruz Biotecnologia, Inc. (Heidelberg, Alemanha)
BACE1	Anti- <i>BACE1</i> antibody (ab2077)	1:1000	Abcam (Cambridge, Inglaterra)	Anticorpo secundário para <i>western blotting</i> reagent pack, Rabbit	1:20000	Santa Cruz Biotecnologia, Inc. (Heidelberg, Alemanha)
GAPDH	<i>GAPDH</i> (14C10) Rabbit mAb	1:1000	Cell Signaling Technology (Leiden, Holanda)			

3.2.19. Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o programa *GraphPad Prism 6*. Todas as experiências realizadas foram repetidas pelo menos três vezes usando preparações de cultura independentes. Os dados nas figuras são expressos como média \pm desvio padrão. Os dados quantitativos foram analisados estatisticamente por análise de variância unidirecional (ANOVA), seguido pelo teste de *Tukey*. * Indica diferença significativa versus células não tratadas, sendo considerado estatisticamente significativo para $p < 0,05$.

4. Resultados e discussão

O pre-miR-29b e o pre-miR-9 já foram descritos em inúmeros estudos científicos como alvos/agentes terapêuticos com aplicação em diversas doenças, como por exemplo na DA. De modo a verificar a potencial ação terapêutica destes microARNs na DA, quer individualmente quer em conjugação, iniciou-se este trabalho de investigação com a produção dos plasmídeos que contêm as sequências humanas do pre-miR-9 e pre-miR-29b, em *Escherichia coli* DH5 α . Estas sequências foram selecionadas recorrendo ao miRBase, que é o repositório oficial dos miARNs. Neste estudo é descrita a utilização dos pre-miARNs ao invés do miARN maduro, uma vez que o seu reconhecimento e processamento na célula são mais eficientes (Tsutsumi *et al.*, 2011). Após a produção recombinante de cada um dos plasmídeos realizou-se a extração/purificação dos mesmos, para posterior amplificação enzimática das sequências do pre-miR-9 e pre-miR-29b por PCR. Por fim, efetuou-se a transcrição *in vitro* para a obtenção dos pre-miR-9 e pre-miR-29b, que foram posteriormente usados na avaliação da capacidade de induzir o silenciamento da expressão da APP, BACE1 e Presenilina, através das técnicas de qRT-PCR, imunocitoquímica e *western blot*.

4.1. Purificação de plasmídeos que codificam pre-miR-9 e pre-miR-29b

Após a extração dos plasmídeos, contendo as sequências do pre-miR-9 e pre-miR-29b, a partir da cultura de *Escherichia coli* DH5 α , estes foram purificados através do kit NZYMiniprep. Para avaliar a purificação das amostras e a qualidade das preparações, em termos de integridade estrutural, foi realizada uma análise espectrofotométrica e eletroforese em gel de agarose (Figura 21).

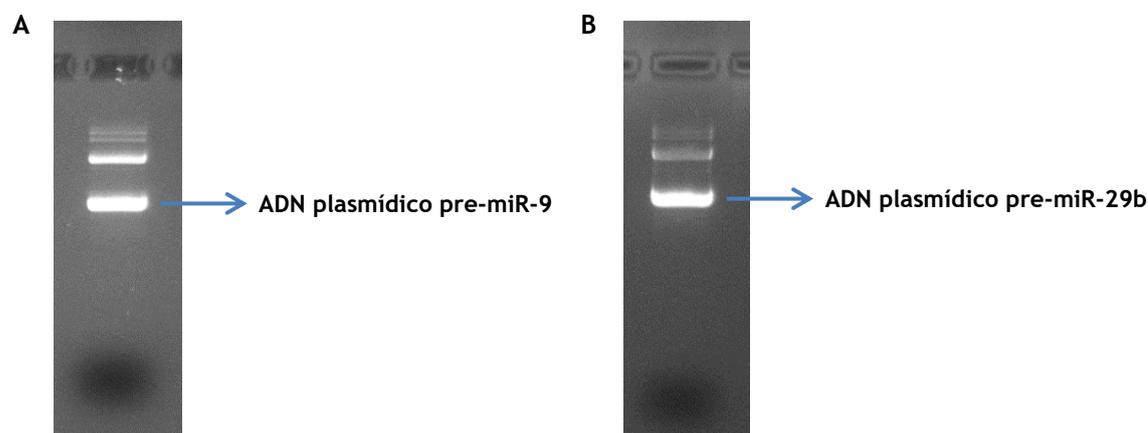
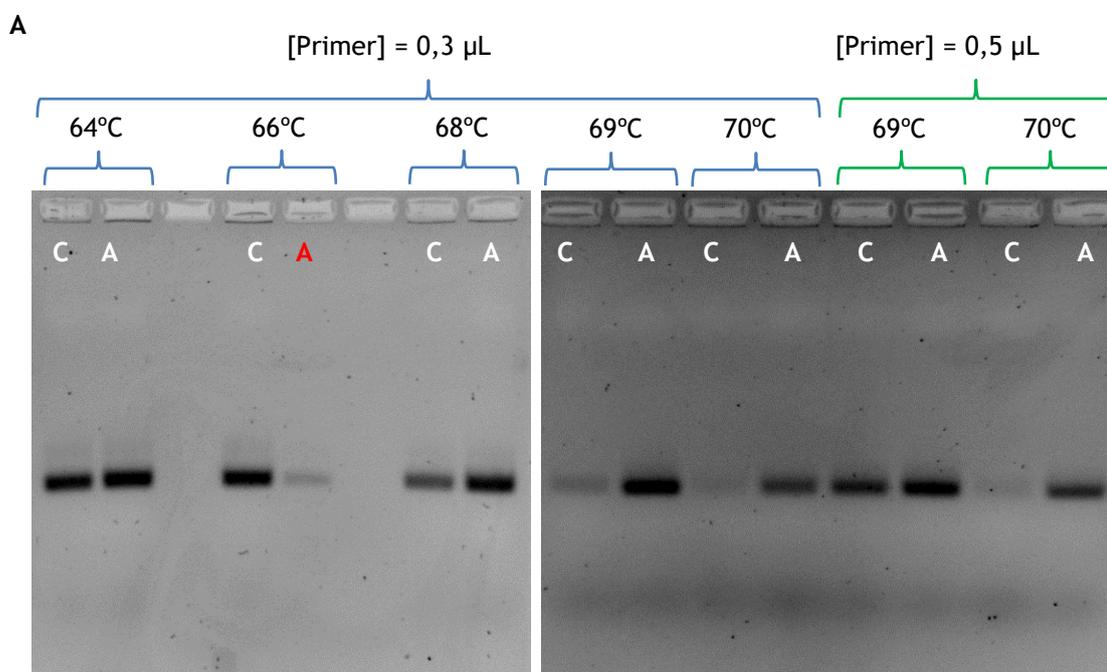


Figura 21. Purificação de extratos de ADN plasmídico de pre-miR-9 e pre-miR-29b. A - Eletroforese em gel de agarose a 1% para verificação da pureza do ADN plasmídico com a sequência do pre-miR-9. B - Eletroforese em gel de agarose a 1% para verificação da pureza do ADN plasmídico com a sequência do pre-miR-29b.

A análise espectrofotométrica permitiu estimar a concentração de ADN utilizando os valores de absorvância a 260 nm, enquanto a pureza de cada amostra foi avaliada calculando a razão A_{260}/A_{280} . De uma forma geral, considera-se que uma razão de $1,80 \pm 0,01$ é frequentemente característica de uma preparação de ADN puro (Farrell 2010). A amostra de ADN plasmídico do pre-miR-9 e do pre-miR-29b apresentaram tipicamente valores de razão 260/280 de aproximadamente 1,8 (no caso das figuras 21A e 21B foram obtidos valores de 1,829 e 1,809 respetivamente) o que representa um elevado nível de pureza, como pode ser comprovado também pela eletroforese da Figura 21A e 21B. Na eletroforese, apesar de serem visíveis bandas mais ténues de maior peso molecular, que podem corresponder a algum ADN genómico, são visualizadas maioritariamente 2 bandas que correspondem a duas isoformas de plasmídeo, estando identificada na imagem a isoforma superenrolada que é mais representativa.

4.2. Amplificação génica por PCR convencional do pre-miR-29b

Para proceder à amplificação das sequências alvo (pre-miR-9 e pre-miR-29), a partir dos plasmídeos purificados, foi necessário realizar a otimização das condições de PCR, nomeadamente a temperatura de *annealing*, concentração de *primers* e número de ciclos, tanto para o pre-miR-9, como para o pre-miR-29b, de forma a obter uma maior amplificação das sequências de interesse sem amplificações inespecíficas.



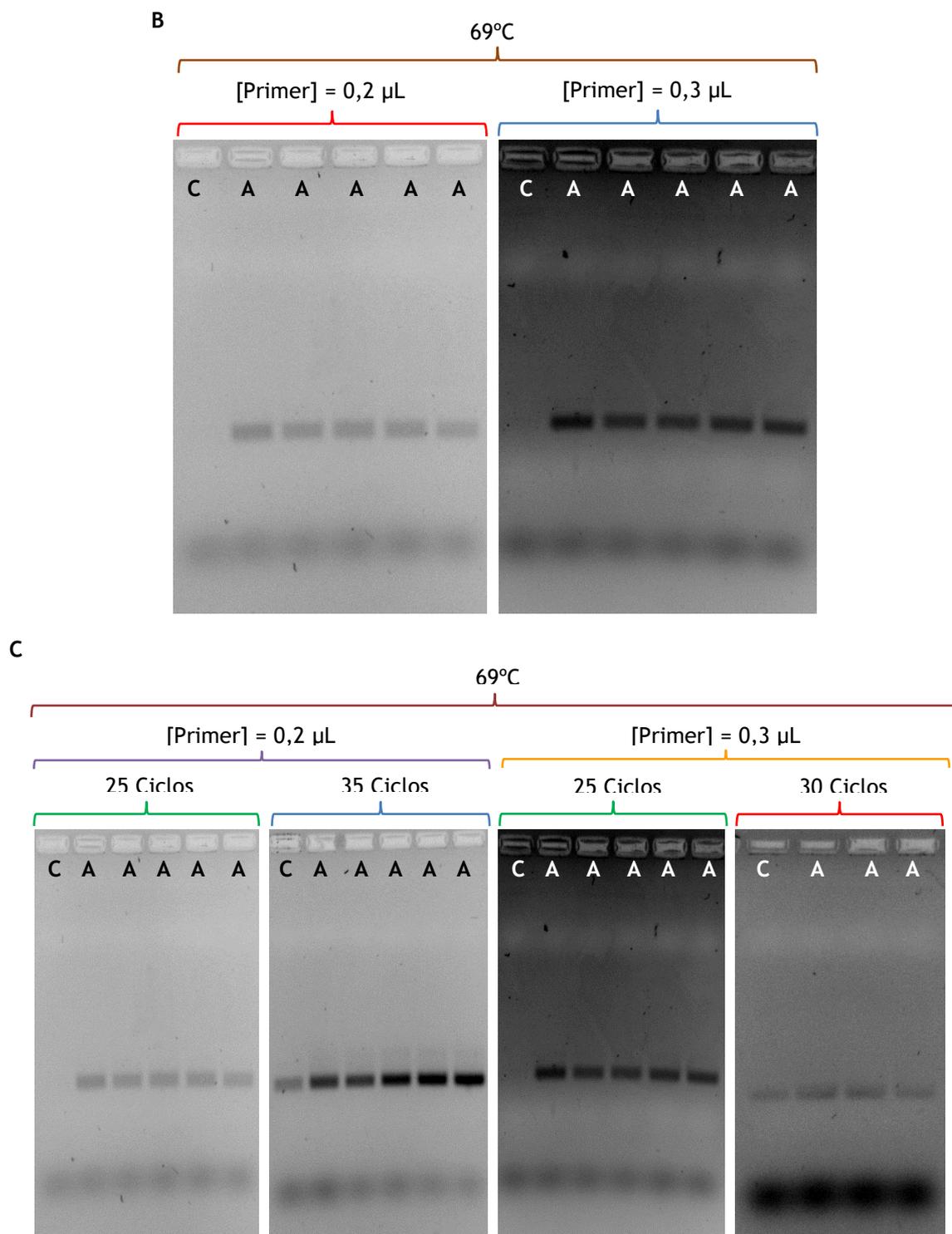


Figura 22. Otimização das condições de PCR para pre-miR-9 e pre-miR-29b. A - Electroforese em gel de agarose a 1% para verificar a otimização da temperatura de *annealing* e quantidade de *primers*. B - Electroforese em gel de agarose a 1% para verificar a otimização da quantidade de *primers*. C - Electroforese em gel de agarose a 1% para avaliar o efeito da quantidade de *primer*, assim como o número de ciclos. C - Controle; A - Amostra; A - Amostra mal aplicada.

Referente à otimização da temperatura de *annealing*, realizaram-se PCRs com 25 ciclos, num intervalo de temperaturas entre os 64 e 68°C, contudo, verificou-se a existência de amplificações inespecíficas (amplificação no controlo). Deste modo, procedeu-se a uma nova otimização, testando as temperaturas de 69 e 70°C, uma vez que quanto maior a temperatura de *annealing*, menor a probabilidade de ocorrência de amplificações inespecíficas. Como se pode verificar pelo gel de agarose da Figura 22A, não foi observada amplificação inespecífica, de valorizar, para estas temperaturas de *annealing*, no entanto, a amplificação do pre-miR-29b foi significativamente maior a 69°C, sendo esta a temperatura de *annealing* estabelecida para amplificar a sequência do pre-miR-29b. A quantidade ótima de *primer* para amplificação do pre-miR-29b foi de 0,3 µL, visto que com uma quantidade superior (0,5 µL) a uma temperatura de 69°C, existia uma amplificação no controlo, o que não seria desejável. Já em quantidades inferiores (0,2 µL), para a mesma temperatura, embora não existissem amplificações inespecíficas, existia uma menor amplificação do pre-miR-29b (Figura 22A e 22B). Relativamente à otimização do número de ciclos do PCR, foram realizados ensaios com 25, 30 e 35 ciclos e verificou-se que o número de ciclos mais adequado foi de 25 ciclos para amplificação da sequência do pre-miR-29b, com uma quantidade de *primer* de 0,3 µL (Figura 22C). Nesta otimização foi ainda constatado que no PCR com 25 ciclos, usando uma quantidade de *primers* de 0,2 µL, a uma temperatura de 69°C, se obtém uma menor amplificação em comparação com o PCR utilizando 0,3 µL de *primers*. Para além disso, com um número de ciclos superior a 25, tanto numa quantidade de *primers* de 0,2 µL ou 0,3 µL, existe amplificação do controlo, logo ocorrem amplificações inespecíficas.

Conclui-se assim que existe uma maior amplificação da sequência de pre-miR-29b, sem amplificação do controlo e com uma menor formação de dímeros, num PCR com 25 ciclos, usando 69°C como temperatura de *annealing* e com uma quantidade de *primers* de 0,3 µL.

4.3. Amplificação génica por PCR convencional do pre-miR-9

Tendo em conta as otimizações realizadas anteriormente para a amplificação do pre-miR-29b, neste caso foi também mantido o número de ciclos (25) e a quantidade de *primers* (0,3 μ L), tendo sido, no entanto otimizada a temperatura de *annealing* para a amplificação do pre-miR-9.

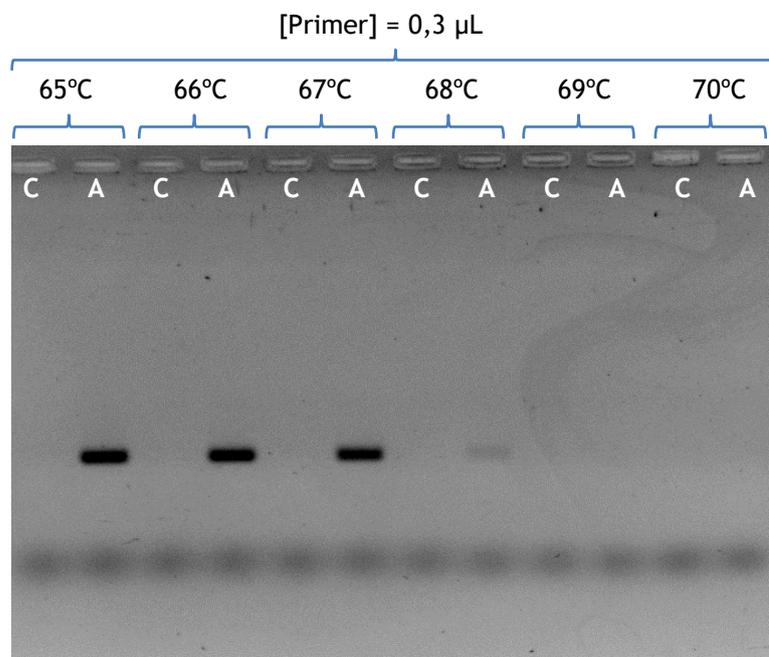


Figura 23. Eletroforese em gel de agarose a 1% para verificar a optimização da temperatura de *annealing* para amplificação do pre-miR-9. C - Controlo; A - Amostra.

Para esta otimização da temperatura de *annealing*, realizou-se um PCR com 25 ciclos, num intervalo de temperaturas entre os 65 e 70°C (Figura 23). Contudo, como se pode verificar pela análise do gel de agarose da Figura 23, não ocorreu amplificação do pre-miR-9 para as temperaturas acima dos 67°C, sendo apenas confirmada para 65, 66 e 67°C. Assim, foi possível selecionar a temperatura de 67°C como a temperatura ótima de *annealing* para o pre-miR-9, sendo igualmente expectável o aumento da especificidade, com redução das ligações inespecíficas.

No geral, e considerando estas condições otimizadas, foi possível observar que os géis de agarose a 1% corados com Greensafe mostram apenas uma banda correspondente ao tamanho do pre-miR-29b ou pre-miR-9, não sendo evidenciada a presença de bandas relativas a contaminação ou amplificações inespecíficas, quer nas amostras quer nos controlos.

4.4. Otimização da transcrição *in vitro*

Após a amplificação das sequências de interesse do pre-miR-9 e pre-miR-29b por PCR, procedeu-se à otimização das condições para a transcrição *in vitro* de forma a obter os respetivos pre-miARNs.

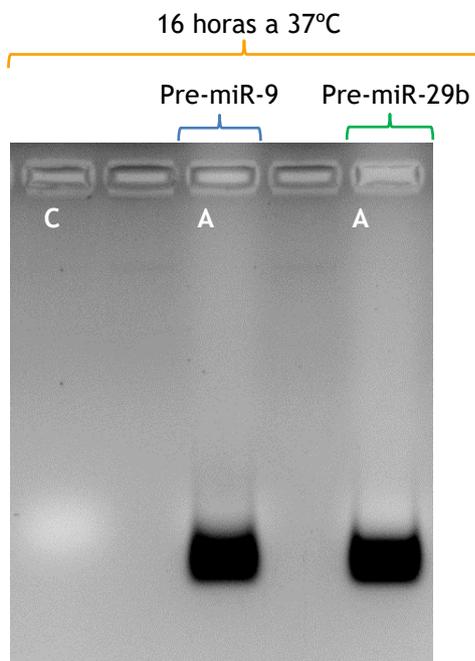


Figura 24. Eletroforese em gel de agarose a 1% para verificar a otimização da temperatura, tempo e quantidade de DNase a usar na transcrição *in vitro*. O ensaio corresponde à transcrição *in vitro* com o pre-miR-9 e pre-miR-29b, a 37°C, durante a 16h. C - Controlo; A - Amostra.

Com os testes realizados, e de acordo com as indicações da bula do kit, determinou-se que o tempo de incubação ótimo para a transcrição *in vitro* seria de 16 horas, a uma temperatura de 37°C. Após a incubação *overnight*, verificou-se que com a adição de 1 μ L de DNase apenas eram obtidas as sequências dos pre-miARNs de interesse, visto que não existe contaminação com ADN não transcrito, tal como é possível observar na imagem representativa da Figura 24.

Confirmada a eficiente transcrição *in vitro* para obtenção dos pre-miR-29b e pre-miR-9, foi possível avançar com os estudos de transfeção.

4.5. Análise da Expressão Proteica por *Western Blot*

De modo a avaliar nas células N2a695, o efeito do pre-miR-9 e do pre-miR-29b, de uma forma isolada ou combinada, na variação da expressão proteica de duas proteínas envolvidas no desenvolvimento e progressão da DA, nomeadamente BACE1 e PS1, realizou-se a técnica de *Western blot*. Assim, foram obtidas bandas com um peso molecular de aproximadamente 76 kDa para a BACE1, 56 kDa para a presenilina e 37 kDa para o *housekeeping*, GAPDH (Figura 25).

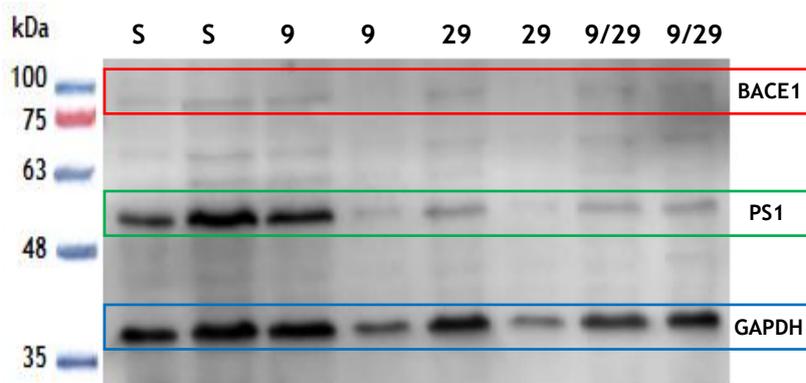


Figura 25. *Western blot* de extratos de proteína total da linha celular N2a695 para estudo do silenciamento da expressão da proteína BACE1 e PS1, após transfeção com o pre-miR-9 e pre-miR-29b individualmente ou em combinação (pre-miR-9 e pre-miR-29b em simultâneo). Marcação com os anticorpos específicos para BACE1, presenilina (PS1) e normalização realizada com GAPDH. S - Amostra proteica de células não transfetadas; 9 - Amostra proteica de células transfetadas com pre-miR-9; 29 - Amostra proteica de células transfetadas com pre-miR-29b; 9/29 - Amostra proteica de células transfetadas com pre-miR-9 + pre-miR-29b.

Os pesos moleculares obtidos para a BACE1, PS1 e GAPDH, após eletrotransferência, são semelhantes aos referenciados pelo fabricante dos anticorpos. Em relação à expressão da proteína BACE1, é possível visualizar, embora de forma ténue, um silenciamento nas células transfetadas com pre-miR-29b individualmente e com pre-miR-9 e pre-miR-29b em simultâneo, em comparação com os níveis de expressão obtidos nas células não transfetadas (S) (Figura 25). Apesar de ser observada esta diferença, o facto de estas bandas se apresentarem com baixa marcação não permitiu realizar a quantificação, pelo que neste caso não foi possível determinar qual o nível de silenciamento promovido por cada espécie de pre-miARN. A impossibilidade de determinar este efeito de uma forma quantitativa também não permite verificar se a co-transfeção com os 2 pre-miARNs em estudo traz algum benefício relativamente à aplicação isolada de cada pre-miARN.

Diversos estudos já descreveram a relação do miR-29 e, conseqüentemente, do pre-miR-29 com a proteína BACE1. De facto a maior parte dos estudos relatam uma correlação entre os elevados níveis de expressão da BACE1 e a diminuição da expressão do miR-29 (Basavaraju and Lencastre 2016; Hébert et al., 2009). No entanto, recentemente Pereira e colaboradores, e Yang e colaboradores foram também estudar qual o impacto do re-estabelecimento dos níveis de miARN nas células neuronais, tendo verificado que aumentando os níveis de pre-miR-29b e miR-29, respetivamente, estes provocariam uma diminuição da expressão da BACE1 (Pereira et al., 2016; Yang et al. 2015). Em particular, o trabalho de Pereira e colaboradores resultou na redução significativa, de aproximadamente 82% da expressão da proteína BACE1 na linha celular N2a695 transfectada com o pre-miR-29b obtido de forma recombinante (Pereira et al., 2016). Embora no presente estudo se tenha utilizado o pre-miR-29b amplificado enzimaticamente e não o recombinante, e apesar de não ser possível a quantificação fidedigna a partir da imagem de *western blot*, aparentemente o tratamento das células com os pre-miARNs em estudo resultou no silenciamento da expressão da BACE1, indo ao encontro dos resultados obtidos previamente por Pereira e colaboradores.

Relativamente à proteína presenilina verificou-se um silenciamento no nível de expressão da mesma em todas as transfecções celulares (Figura 26).

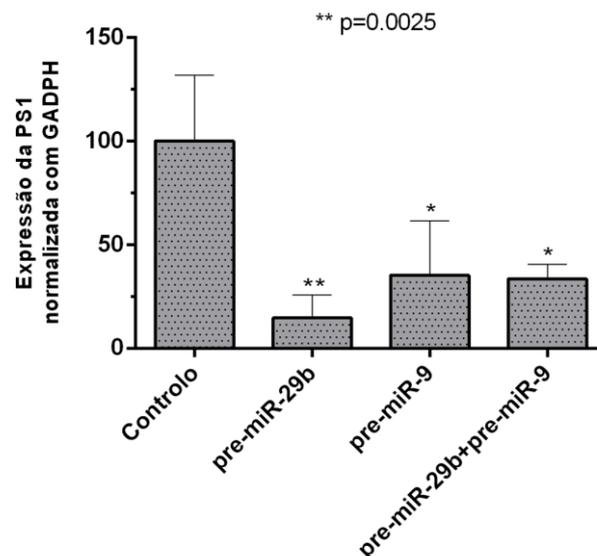


Figura 26. Níveis de expressão obtidos por *western blot* da linha celular N2a695 para estudo do silenciamento da expressão da presenilina, após transfecção com o pre-miR-9 e o pre-miR-29b individualmente e pre-miR-9 e pre-miR-29b em simultâneo. Controlo - Células não transfectadas; pre-miR-29b - Células transfectadas com pre-miR-29b; pre-miR-9 - Células transfectadas com pre-miR-9; pre-miR-29b+pre-miR-9 - Células transfectadas com pre-miR-9 e pre-miR-29b em simultâneo. One-way ANOVA seguido por teste de Tukey foi usado para a análise estatística relativamente ao controlo (células não transfectadas). Os resultados são considerados estatisticamente significativos quando $p < 0.05$. Os gráficos de barras representam médias \pm SEM para um $n \geq 3$.

Relativamente à proteína presenilina verificou-se um silenciamento no nível de expressão da mesma em todas as transfecções celulares. A maior inibição no nível de expressão proteica da presenilina foi obtida nas células transfetadas somente com pre-miR-29b, com uma percentagem de inibição de 85 (Figura 26). Esta maior inibição induzida pelo pre-miR-29b, poderá dever-se a uma maior especificidade e complementaridade deste miARN ao transcrito que corresponde à proteína alvo (presenilina), em comparação com o pre-miR-9. Este resultado embora muito interessante necessita de ser confirmado por outras técnicas, pois não foram encontrados estudos que relacionem o miR-29 e a presenilina. Relativamente ao efeito do miR-9, Maes e colaboradores demonstraram haver uma relação entre este miARN e a presenilina, sugerindo que a sobre-expressão da presenilina poderia estar associada com o declínio dos níveis de miR-9 na DA (Maes et al., 2009). Os resultados obtidos estão de acordo com os descritos por Maes, visto que com a utilização do pre-miR-9, foram obtidos valores inferiores nos níveis de expressão da presenilina relativamente às células não transfetadas. O nível de inibição da expressão da presenilina nas células N2a695 transfetadas com pre-miR-9 foi de 65% e no caso da co-transfecção com pre-miR-9 e pre-miR-29b foi obtida uma inibição de 66% (Figura 26). Estes resultados sugerem que não existe propriamente uma vantagem associada à transfecção combinada com os 2 pre-miARNs, já que o silenciamento que se verificou (66%) é idêntico ao obtido na transfecção com apenas pre-miR-9 (65%) e ainda menor do que o obtido com pre-miR-29b (85%). Uma possível explicação poderá ser o facto de a célula e a sua maquinaria de processamento de pre-miARNs atingir um nível de saturação ou sobrecarga com a transfecção combinada, não resultando nenhum sinergismo em termos de potenciar a ação de silenciamento. Ao contrário do que aconteceu no estudo de Su e colaboradores, não se verificou sinergia. Porém, trata-se de mecanismos diferentes e por isso, podem existir casos em que ocorre sinergia e casos em que não ocorre (Su *et al.*, 2013). No entanto poderia ser também importante avaliar a ação sobre outros alvos e verificar se a tendência se mantém ou se surgem novas evidências de inter-relação e inter-regulação.

4.6. Imunocitoquímica

O silenciamento da expressão de algumas proteínas referentes à via amiloigênica, nomeadamente presenilina (Figura 27) e BACE1 (Figura 29), foi também avaliado por imunocitoquímica, após incubação com o respetivo anticorpo primário e visualização por microscopia de confocal.

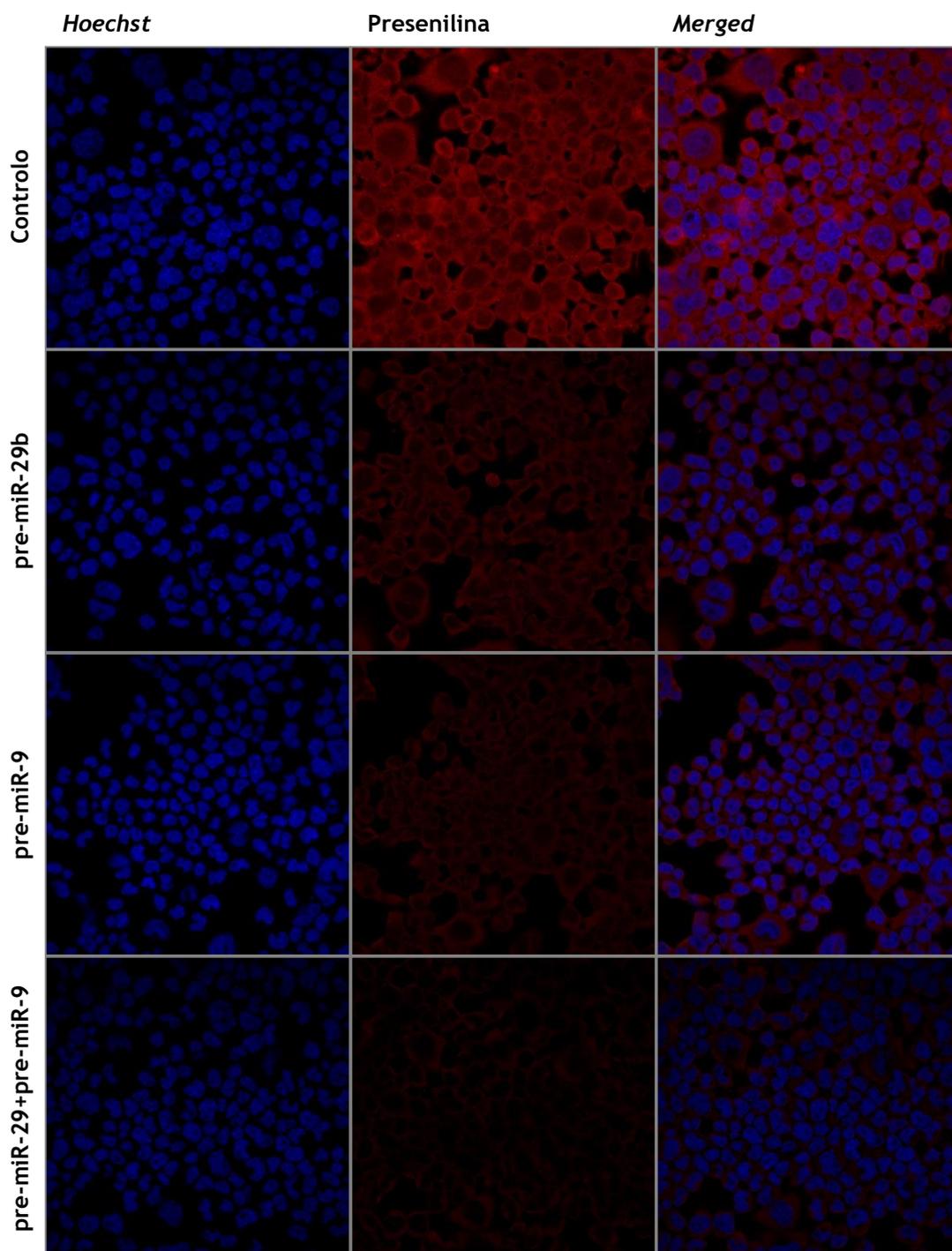


Figura 27. Imagens representativas de imunocitoquímica por microscopia confocal da linha celular N2a695 para estudo do silenciamento da expressão da presenilina, após transfeção com o pre-miR-9 e o pre-miR-29b individualmente e pre-miR-9 e pre-miR-29b em simultâneo. Fluoróforos: *Hoechst* 33342[®], *AlexaFluor* 488[®] and *AlexaFluor* 546[®] (Invitrogen).

Embora a imunocitoquímica não seja a técnica mais adequada para quantificação da expressão proteica, pois é considerada uma técnica semi-quantitativa, esta permite ter uma ideia geral da quantidade de proteína alvo presente a nível celular.

O silenciamento da expressão da presenilina foi obtido quer nas células transfetadas com pre-miR-9 e pre-miR-29b individualmente, quer simultaneamente (Figura 27 e 28).

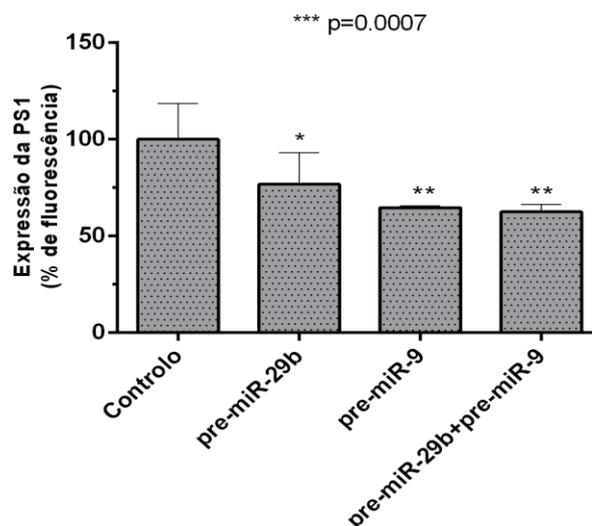


Figura 28 - Níveis de expressão obtidos por imunocitoquímica da linha celular N2a695 para estudo do silenciamento da expressão da presenilina, após transfeção com o pre-miR-9 e o pre-miR-29b individualmente e pre-miR-9 e pre-miR-29b em simultâneo. Controlo - Células não transfetadas; pre-miR-29b - Células transfetadas com pre-miR-29b; pre-miR-9 - Células transfetadas com pre-miR-9; pre-miR-29b+pre-miR-9 - Células transfetadas com pre-miR-9 e pre-miR-29b em simultâneo. One-way ANOVA seguido por teste de Tukey foi usado para a análise estatística relativamente ao controlo (células não transfetadas). Os resultados são considerados estatisticamente significativos quando $p < 0.05$. Os gráficos de barras representam médias \pm SEM para um $n \geq 3$.

Verificou-se uma maior percentagem de inibição da expressão da presenilina nas células transfetadas com pre-miR-9 e pre-miR-29b em simultâneo, de aproximadamente 37%. No entanto, o nível de inibição verificado nas células transfetadas apenas com pre-miR-9 é muito semelhante ao obtido com o pre-miR-9 e pre-miR-29b em simultâneo, com uma percentagem de silenciamento de 35% (Figura 28). Mais uma vez estes resultados vão de encontro às afirmações de Maes e colaboradores de que existe uma relação causal entre o miR-9 e a presenilina (Maes et al., 2009), e relacionam-se também com o resultado obtido por Western blot. O resultado semelhante do silenciamento da presenilina em células transfetadas com o pre-miR-9 individualmente e nas células transfetadas com o pre-miR-9 e pre-miR-29b em simultâneo poderá ser explicado, com base na ação evidenciada do pre-miR-9 no silenciamento da presenilina, não se verificando a influência do pre-miR-29b na presenilina. Contudo, este resultado poderá ser um possível indicador de que o pre-miR-29b também tem um papel crucial no silenciamento da presenilina. Esta hipótese pode ser demonstrada, visto que se obtém um silenciamento na expressão da presenilina (menor % de fluorescência) com o pre-miR-29b, de cerca de 23% (Figura 28). Ainda assim serão necessários mais estudos para a sua

confirmação, visto que ao contrário dos resultados obtidos por *western blot*, na imunocitoquímica, a percentagem de inibição da expressão da presenilina foi inferior nas células transfetadas com o pre-miR-29b, em relação às restantes transfecções.

Relativamente à expressão da BACE1 nas células N2a695 transfetadas com pre-miR-9 e pre-miR-29b quer individualmente, quer em simultâneo, verificaram-se níveis de silenciamentos distintos aos da presenilina (Figura 29 e 30).

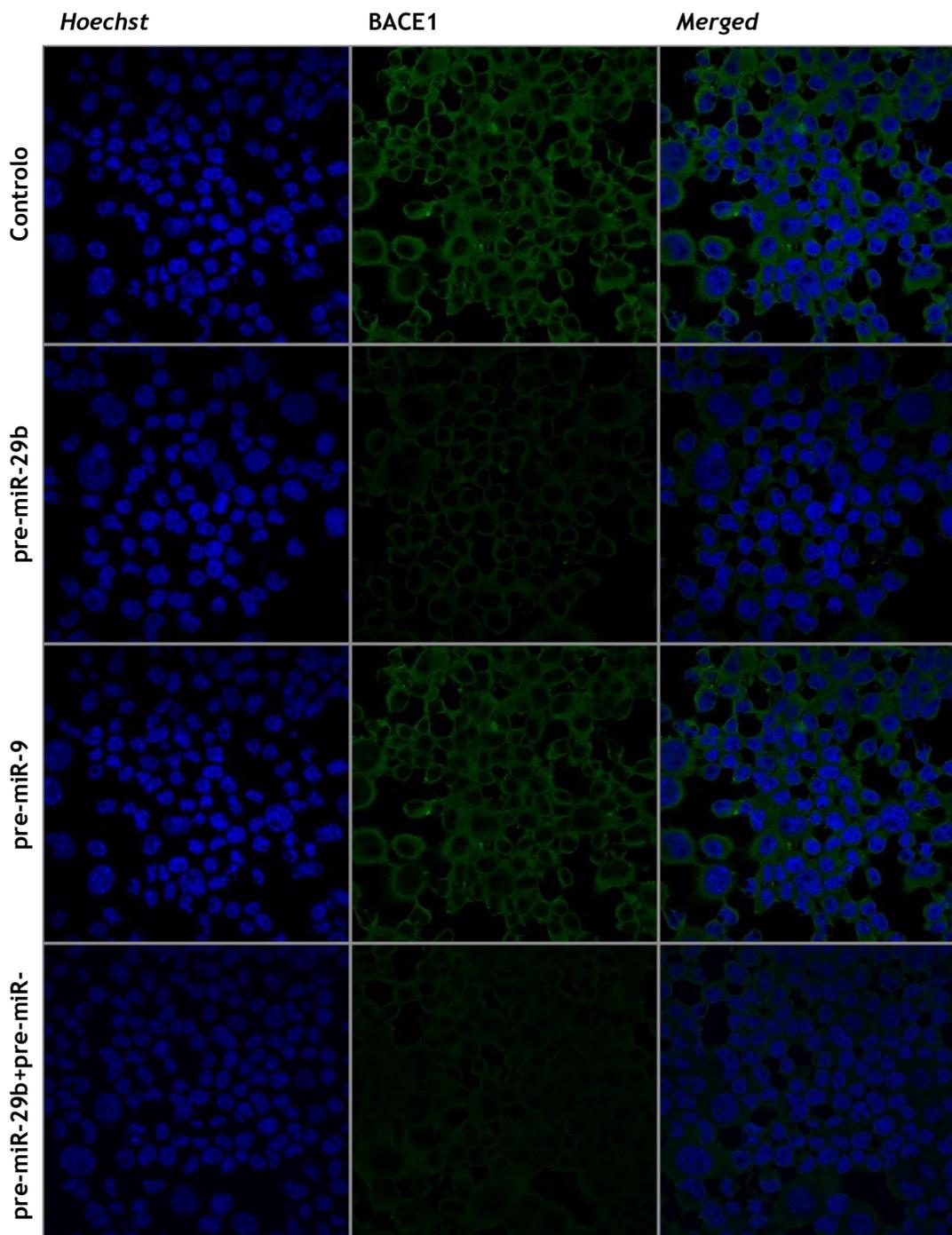


Figura 29. Imagens representativas de imunocitoquímica por microscopia confocal da linha celular N2a695 para estudo do silenciamento da expressão da BACE1, após transfecção com o pre-miR-9 e o pre-miR-29b individualmente e pre-miR-9 e pre-miR-29b em simultâneo. Fluoróforos: *Hoechst* 33342[®], *AlexaFluor* 488[®] and *AlexaFluor* 546[®] (Invitrogen).

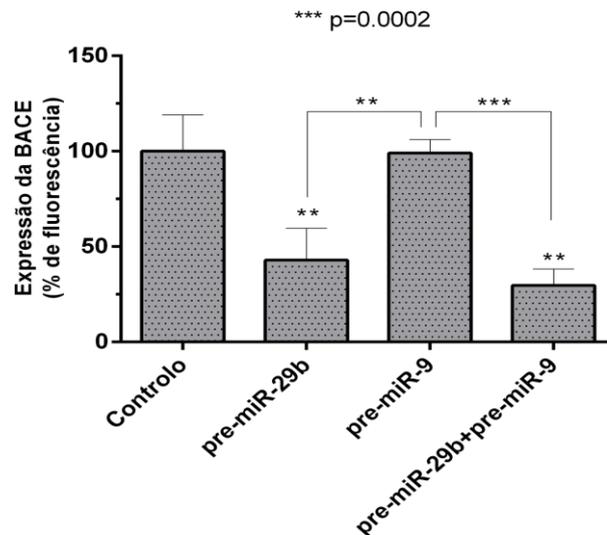


Figura 30. Níveis de expressão obtidos por imunocitoquímica da linha celular N2a695 para estudo do silenciamento da expressão da BACE1, após transfecção com o pre-miR-9 e o pre-miR-29b individualmente e pre-miR-9 e pre-miR-29b em simultâneo. Controlo - Células não transfetadas; pre-miR-29b - Células transfetadas com pre-miR-29b; pre-miR-9 - Células transfetadas com pre-miR-9; pre-miR-29b+pre-miR-9 - Células transfetadas com pre-miR-9 e pre-miR-29b em simultâneo. One-way ANOVA seguido por teste de Tukey foi usado para a análise estatística relativamente ao controlo (células não transfetadas). Os resultados são considerados estatisticamente significativos quando $p < 0.05$. Os gráficos de barras representam médias \pm SEM para um $n \geq 3$.

Neste estudo verificou-se um silenciamento acentuado da BACE1, quer nas células transfetadas com o pre-miR-29b individualmente, quer com a combinação dos dois pre-miRs (pre-miR-9 e pre-miR-29b em simultâneo) e praticamente não foi obtido nenhum silenciamento nas células transfetadas apenas com o pre-miR-9, observando-se apenas um silenciamento de cerca de 1%. De facto, existiu um maior silenciamento da BACE1, nas células transfetadas com pre-miR-9 e pre-miR-29b em simultâneo, comparativamente ao uso do pre-miR-29b individualmente, obtendo-se silenciamentos de 70% e 57%, respetivamente (Figura 29 e 30).

De uma forma geral, nos resultados da imunocitoquímica, podemos observar a existência de uma tendência para um maior silenciamento da expressão da presenilina e da BACE1 usando o pre-miR-9 e pre-miR-29b em simultâneo, em relação ao seu uso individual. No entanto, o silenciamento da BACE1, apenas com pre-miR-29b, não é muito distinto do ocorrido com pre-miR-9 e pre-miR-29b em simultâneo. Isto poderá ser explicado, devido à ação notória e significativa do pre-miR-29b no silenciamento da BACE1, porém também poderá ser um indicador de que o pre-miR-9 tem um papel no silenciamento da BACE1. No seu estudo anterior, Pereira e colaboradores demonstraram que após 72h de transfecção com CS/pre-miR-29b recombinante, a expressão da proteína BACE1 é reduzida em aproximadamente 78% (Pereira et al., 2016). Neste estudo observou-se a mesma tendência do estudo de Pereira e colaboradores, uma diminuição de 57% da BACE1 com o uso de pre-miR-29b. O menor

silenciamento por parte do pre-miR-29b deste estudo, poderá ser devido ao uso de um transcrito de pre-miR-29b e não um pre-miR-29b recombinante. O uso de um pre-miR transcrito apresenta desvantagens em relação a um pre-miR recombinante. A principal desvantagem do uso de um pre-miR transcrito verifica-se durante o processo de amplificação por PCR (usado neste estudo) e no processo de transcrição. Estas duas técnicas poderão apresentar erros durante a amplificação pela taq ADN polimerase e na transcrição por parte da T7 ARN polimerase. Estes erros levam à produção impurezas, formando produtos aberrantes, distintos dos pre-miRs pretendidos, que não serão complementares aos ARNm alvo, levando a uma diminuição do silenciamento relativamente aos pre-miRs recombinantes (Pereira et al., 2016).

4.7. Análise da Expressão Génica por RT-qPCR

Para comprovar os resultados obtidos anteriormente, por RT-qPCR estudou-se o silenciamento da expressão génica de algumas proteínas referentes à via amiloigénica, entre as quais, BACE1, presenilina e APP, de modo a verificar a existência de variações ao nível da expressão do ARNm das proteínas em estudo.

Quanto ao silenciamento da expressão do ARNm da BACE1, obtiveram-se resultados contraditórios relativamente a estudos já existentes (Pereira et al., 2016; Yang et al. 2015) e aos resultados obtidos por imunocitoquímica. Pereira e colaboradores observaram que os níveis de ARNm da BACE1 nas células N2a695 foram significativamente reduzidos após o tratamento com o pre-miR-29b recombinante (Pereira et al., 2016). No entanto, neste estudo não se verificou nenhum nível de silenciamento na expressão do ARNm da BACE1, quer nas células tranfectadas com o pre-miR-9 e pre-miR-29b individualmente, quer em simultâneo, contrariando também estudos que relatam a influência do miR-29 na expressão da BACE1 (Tan et al., 2013). Assim sendo, face aos resultados obtidos será necessário realizar mais estudos/testes ao nível do ARNm da BACE1, já que esta diferença poderá não corresponder ao que efetivamente se passa na célula, havendo necessidade de despistar qualquer erro ou interferência experimental.

No entanto, foram obtidos resultados interessantes ao nível do silenciamento da expressão do ARNm da proteína presenilina e APP (Figura 31 e 32, respetivamente).

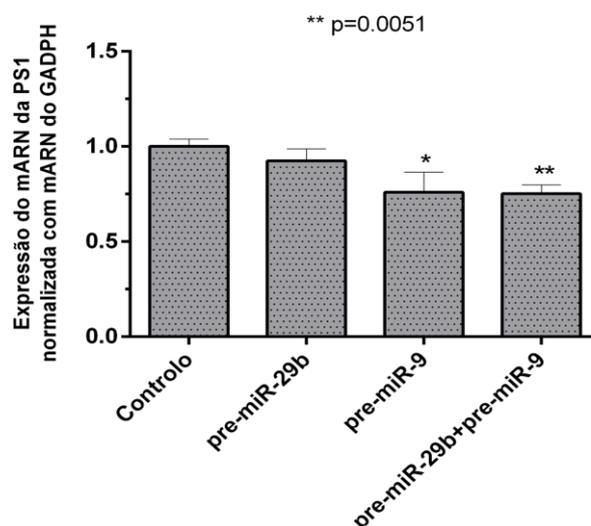


Figura 31. Níveis de expressão obtidos por RT-qPCR para avaliar o silenciamento da expressão do ARNm da presenilina na linha celular N2a695, após transfecção com o pre-miR-9 e pre-miR-29b individualmente e pre-miR-9 e pre-miR-29b em simultâneo. Controlo - Células não transfectadas; pre-miR-29b - Células transfectadas com pre-miR-29b; pre-miR-9 - Células transfectadas com pre-miR-9; pre-miR-29b+pre-miR-9 - Células transfectadas com pre-miR-9 e pre-miR-29b em simultâneo. One-way ANOVA seguido por teste de Tukey foi usado para a análise estatística relativamente ao controlo (células não transfectadas). Os resultados são considerados estatisticamente significativos quando $p < 0.05$. Os gráficos de barras representam médias \pm SEM para um $n \geq 3$.

Tanto nas células transfectadas com pre-miR-9 e pre-miR-29b individualmente, quer simultaneamente, ocorreu silenciamento ao nível da expressão do ARNm da presenilina, sendo mais evidenciado, nas células transfectadas com pre-miR-9 e pre-miR-29b em simultâneo, onde se verificou uma inibição de aproximadamente 25%. No entanto, tal como nos resultados obtidos na imunocitoquímica da presenilina, o silenciamento génico verificado apenas com pre-miR-9 é muito semelhante ao ocorrido com pre-miR-9 e pre-miR-29b em simultâneo, tendo sido de aproximadamente 24% (Figura 31). Mais uma vez, estes resultados estão de acordo com os obtidos por Maes e colaboradores que afirmam a existência de uma relação do miR-9 com a presenilina, evidenciando a sua ação no silenciamento da presenilina (Maes et al., 2009). Os nossos resultados também poderão ser um indicador de uma possível ação do pre-miR-29b no silenciamento da presenilina, visto que se obtém uma ligeira inibição no nível de expressão do gene da presenilina com o pre-miR-29b, 8% (Figura 31). Este resultado segue a mesma tendência dos resultados obtidos em imunocitoquímica. Ainda assim serão necessários mais estudos para a sua confirmação, visto que o silenciamento da presenilina pelo pre-miR-29b não foi superior aos restantes resultados obtidos por *western blot*, e não foi ainda encontra evidência científica sobre esta regulação.

Relativamente ao silenciamento da expressão do gene da APP foram obtidos resultados muito interessantes, pois na pesquisa realizada, não existem muitos estudos que relacionem o papel do pre-miR-9 e o pre-miR-29b no silenciamento da APP, sendo que apenas um artigo relaciona os baixos níveis de expressão do miR-9 com os elevados níveis de expressão da APP (Hong *et al.*, 2017). Hong e colaboradores através do uso de ratos transgênicos (APP^{swe}/PSEN1^{dE9}), que sobre-expressam a APP e presenilina, verificaram que com o aumento dos níveis de expressão da APP e presenilina, se obtinham valores inferiores de miR-9 em relação ao controlo (ratos saudáveis), sendo consistente com os valores de pacientes com DA.

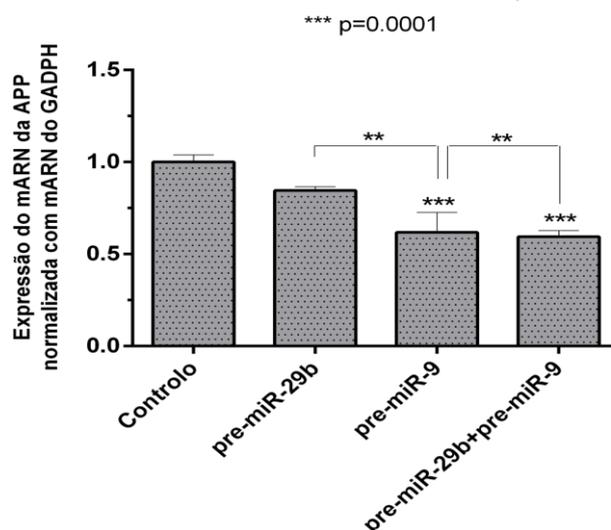


Figura 32. Níveis de expressão obtidos por RT-qPCR para avaliar o silenciamento da expressão do ARNm da APP na linha celular N2a695, após transfecção com o pre-miR-9 e pre-miR-29b individualmente e pre-miR-9 e pre-miR-29b em simultâneo. Controlo - Células não transfectadas; pre-miR-29b - Células transfectadas com pre-miR-29b; pre-miR-9 - Células transfectadas com pre-miR-9; pre-miR-29b+pre-miR-9 - Células transfectadas com pre-miR-9 e pre-miR-29b em simultâneo. One-way ANOVA seguido por teste de Tukey foi usado para a análise estatística relativamente ao controlo (células não transfectadas). Os resultados são considerados estatisticamente significativos quando $p < 0.05$. Os gráficos de barras representam médias \pm SEM para um $n \geq 3$.

O silenciamento ao nível da expressão do gene da APP foi obtido nas células transfectadas com o pre-miR-9 e pre-miR-29b quer individualmente, quer em simultâneo. No entanto, verificou-se uma maior percentagem de inibição do gene da APP, nas células transfectadas com pre-miR-9 e pre-miR-29b em simultâneo, obtendo-se um silenciamento de 41% (Figura 32). Estes resultados são interessantes, pois não existe quase nenhum artigo que relacione estes miARNs à APP. Devido a isso não se esperaria observar um silenciamento da APP por parte do pre-miR-9 e pre-miR-29b mas sim na presenilina e na BACE1, respetivamente (Hong *et al.*, 2017; Pereira *et al.*, 2016). Deste modo, os resultados obtidos demonstram uma possível relação do miR-9 com a expressão da APP, tal como no estudo de Hong e colaboradores, onde se verificou que aumentando a expressão da APP e presenilina, ocorre uma diminuição do miR-9, em cerca de 40%. Neste estudo estabeleceu-se uma relação inversa, pois ao aumentar o pre-miR-

9 e conseqüentemente o miR-9, verificou-se uma diminuição da APP, em cerca de 38%, o que vem reforçar a relação do miR-9 com a APP (Hong *et al.*, 2017).

Tal como nos resultados obtidos na imunocitoquímica e no RT-qPCR da presenilina, na APP verifica-se também uma relação do silenciamento do pre-miR-9 com o silenciamento do pre-miR-9 e pre-miR-29b em simultâneo, uma vez que o silenciamento verificado apenas com pre-miR-9, de 38%, é muito semelhante ao ocorrido com pre-miR-9 e pre-miR-29b em simultâneo (41%) (Figura 32). Mais uma vez isso poderá ser explicado, devido à ação evidenciada pelo pre-miR-9 no silenciamento da APP, no entanto, também poderá ser um indicador de que o pre-miR-29b tem um papel no silenciamento da APP, tal como ocorria com a presenilina. Este indicador poderá ser reforçado, visto que se obteve um silenciamento da expressão do ARNm da APP com o pre-miR-29b, com cerca 15% (Figura 32). Ainda assim serão necessários mais estudos com diferentes técnicas para a sua confirmação.

Os mecanismos de ação destes pre-miRs devem ser mais aprofundados e verificar o efeito em outros ARNm alvos, para que se consiga “desvendar” mais sobre a patologia, o que será crucial para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

5. Conclusão e Perspetivas Futuras

Devido ao seu enorme potencial de silenciamento, os miARNs, funcionam suprimindo o processo de tradução, que leva à redução dos níveis proteicos associados ao surgimento e progressão de determinadas doenças. Desta forma procurou-se estudar a relação do pre-miR-9 e pre-miR-29b, com algumas proteínas associadas aos mecanismos patológicos da DA. A realização deste trabalho permitiu identificar e confirmar a relação de alguns miARNs com a DA. Verificou-se a relação do pre-miR-9 e consequentemente do miR-9 com a presenilina, tanto em resultados por RT-qPCR, imunocitoquímica e *western blot*. Por RT-qPCR e imunocitoquímica verificou-se um silenciamento superior da presenilina quando as células foram transfetadas com o pre-miR-9 relativamente ao pre-miR-29b. Apesar de existirem ligeiras diferenças, os resultados não nos permitem confirmar uma ação sinérgica do pre-miR-9 e pre-miR-29b no silenciamento da presenilina, já que os resultados de silenciamento foram sempre bastante idênticos quando as células foram co-transfetadas com ambos os pre-miARNs ou com cada um de forma isolada. Um dado muito interessante que se obteve neste trabalho, e que deverá ser particularmente explorado e aprofundado, foi a influência do pre-miR-29b na regulação da expressão da presenilina, pois na pesquisa realizada, não foi encontrado nenhum estudo que mencionasse esta relação. Este efeito foi confirmado em todos os estudos realizados (RT-qPCR, imunocitoquímica e *western blot*), embora com maior relevância nos estudos de *western blot*, que contrariamente aos estudos realizados por RT-qPCR e imunocitoquímica, revelou um silenciamento superior do pre-miR-29b em relação ao pre-miR-9 quer individualmente, quer em simultâneo com o pre-miR-29b. De uma forma geral, e considerando os resultados das várias técnicas, confirmou-se que a expressão da presenilina é regulada, sofrendo silenciamento, com a transfeção dos 2 miARNs em estudo, não havendo evidência significativa que a co-transfeção possa produzir um efeito sinérgico.

Relativamente à BACE1, através de estudos de imunocitoquímica, conseguiu-se consolidar e obter resultados concordantes com a relação já descrita entre o pre-miR-29b e consequentemente do miR-29b com o silenciamento da BACE1. De salientar que nos ensaios realizados se verificou um silenciamento superior quando as células foram transfetadas com o pre-miR-29b comparativamente à transfeção com pre-miR-9. No entanto, de acordo com a literatura, já seria expectável que o pre-miR-9 pudesse ter ação no silenciamento quer da BACE1 quer da presenilina. Apesar de esse efeito não ter sido confirmado na transfeção do modelo celular com apenas pre-miR-9, a ação conjunta dos 2 pre-miARNs conduziu a uma inibição ligeiramente superior à encontrada na transfeção com apenas pre-miR-29b.

Para além dos dados relevantes obtidos tanto para a regulação da expressão da presenilina como para a BACE1, obtiveram-se também resultados interessantes e que devem ser aprofundados para a regulação da expressão da APP. Através de RT-qPCR verificou-se um silenciamento significativo, entre 20-25%, da APP, quer após transfeção das células com pre-miR-9 quer com o pre-miR-29b. Com base nestes resultados, poderá supor-se uma possível relação regulatória destes pre-miRs sobre a APP. No caso, a transfeção com os pre-miARNs

isolados, revelou uma ação superior do pre-miR-9 relativamente ao pre-miR-29b. Observou-se ainda a existência de um silenciamento ligeiramente superior quando ambos os pre-miARNs foram transferidos para as células, mas o potencial sinérgico não pode ainda ser confirmado, pelo que será necessário realizar estudos adicionais.

Em suma, com o trabalho realizado foi possível verificar uma relação quer do pre-miR-9, quer do pre-miR-29b na regulação da expressão das proteínas estudadas (presenilina, BACE1 e APP). Embora os resultados obtidos nestes estudos pareçam promissores, é necessário realizar ainda estudos adicionais de forma a aprofundar os mecanismos de silenciamento envolvidos e explorar as evidências encontradas. Num futuro próximo, pretende-se confirmar a relação destes pre-miRs com a inibição da expressão da presenilina e BACE1. De uma forma mais específica, será interessante confirmar a ação regulatória do pre-miR-29b sobre a expressão da presenilina, já que não foram encontrados estudos que o reportem, assim como confirmar a possível relação destes pre-miRs com o silenciamento APP, que não foram ainda evidenciados na literatura.

6. Referências Bibliográficas

Alagiakrishnan K., Gill S.S. and Fagarasanu A. 2012. "Genetics and epigenetics of Alzheimer's disease.". *Postgrad Med J.* 88(1043): 522-529.

Audagnotto M., Lorkowski A.K. and Peraro M.D. 2017. "Recruitment of the Amyloid Precursor Protein by γ -Secretase at the Synaptic Plasma Membrane.". *Biochemical and Biophysical Research Communications*: 1-8.

Aydemir Y.Y., Simkin A., Gascon E., and Biao G.F. 2011. "MicroRNA-9.". *RNA Biology* 8(4): 557-64.

Bali J., Halima S.B., Felmy B., Goodger Z., Zurbriggen S. and Rajendran L. 2010. "Cellular Basis of Alzheimer's Disease.". *Annals of Indian Academy of Neurology* 13, (SUPPL. 2): S89-93.

Ballard C., Gauthier S., Corbett A., Brayne C., Aarsland D. and Jones E. 2011. "Alzheimer's disease.". *Lancet* . 377(9770):1019-1031.

Barage S.H. and Sonawane K.D. 2015. "Amyloid Cascade Hypothesis: Pathogenesis and Therapeutic Strategies in Alzheimer's Disease." *Neuropeptides* 52: 1-18.

Basavaraju M. and Lencastre A.D. 2016. "Alzheimer's disease: presence and role of microRNAs." *Biomol Concepts* 7(4): 241-52.

Batistela M.S., Josviak N.D., Sulzbach C.D. and Souza R.L.R. 2017. "An Overview of Circulating Cell-Free microRNAs as Putative Biomarkers in Alzheimer's and Parkinson's Diseases.". *International Journal of Neuroscience* 127(6): 547-58.

Briggs R., Kennelly S.P. and O'Neill D. 2016. "Drug Treatments in Alzheimer's Disease.". *Clinical medicine (London, England)* 16(3): 247-53.

Brinkmalm G., Brinkmalm A., Bourgeois P., Persson R., Hansson O., Portelius E., Mercken M., Andreasson U., Parent S., Lipari F., Ohrfelt A., Bjerke M., Minthon L., Zetterberg H., Blennow K. and Nutu M. 2013. "Soluble Amyloid Precursor Protein α and β in CSF in Alzheimer's Disease.". *Brain Research* 1513: 117-26.

Cai T., Yonaga M. and Tomita T. 2017. "Activation of γ -Secretase Trimming Activity by Topological Changes of Transmembrane Domain 1 of Presenilin 1.". *The Journal of neuroscience* 37(50): 12272-12280.

Chang F., Zhang L.H., Xu W.P., Jing P. and Zhan P.Y. 2014. "microRNA-9 Attenuates Amyloid β -Induced Synaptotoxicity by Targeting Calcium/calmodulin-Dependent Protein Kinase Kinase 2.". *Molecular Medicine Reports* 9(5): 1917-22.

Che H., Sun L.H., Guo F., Niu H.F., Su X.L., Bao Y.N., Fu Z.D., Liu H.L., Hou X., Yang B.F. and Ai J. 2014. "Expression of Amyloid-Associated MiRNAs in Both the Forebrain Cortex and Hippocampus of Middle-Aged Rat.". *Cellular Physiology and Biochemistry* 33(1): 11-22.

Chen J.J., Zhao B., Zhao J. and Li S. 2017. "Potential Roles of Exosomal MicroRNAs as Diagnostic Biomarkers and Therapeutic Application in Alzheimer's Disease.". *Neural Plasticity* vol. 2017: 12.

Christensen D.D. 2007. "Changing the Course of Alzheimer's Disease: Anti-Amyloid Disease-Modifying Treatments on the Horizon.". *Primary care companion to the Journal of clinical psychiatry* 9(1): 32-41.

Chu J. and Praticò D. 2016. "The 5-Lipoxygenase as Modulator of Alzheimer's γ -Secretase and Therapeutic Target.". *Brain Research Bulletin* 126(March): 207-12.

Coolen M., Katz S. and Bally-Cuif L. 2013. "miR-9: A Versatile Regulator of Neurogenesis.". *Frontiers in cellular neuroscience* 7(November): 220.

Czech B. and Hannon G.J. 2011. "Small RNA Sorting: Matchmaking for Argonauts.". *Nature Reviews Genetics* 12(1): 19-31.

Daugaard I. and Hansen T.B. 2017. "Biogenesis and Function of Ago-Associated RNAs.". *Trends in Genetics* 33(3): 208-19.

Delay C., Mandemakers W. and Hébert S.S. 2012. "MicroRNAs in Alzheimer's Disease.". *Neurobiology of Disease* 46(2): 285-90.

Dries V.V., Stygelbout V., Pierrot N., Yilmaz Z., Suain V., Decker R.D., Buée L., Octave J.N., Brion J.P. and Leroy K. 2017. "Amyloid Precursor Protein Reduction Enhances the Formation of Neurofibrillary Tangles in a Mutant Tau Transgenic Mouse Model.". *Neurobiology of Aging* 55: 202-12.

Duggan S.P. and McCarthy J.V. 2016. "Beyond γ -Secretase Activity: The Multifunctional Nature of Presenilins in Cell Signalling Pathways.". *Cellular Signalling* 28(1): 1-11.

Durán M.D.P., Moreno V.Z., Silva I.V., Medina J.J.G. and Castillo J.B. 2015. "Present and Future of Ribonucleic Acid Interference.". *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología (English Edition)* 90(1): 1-3.

Farrell R.E. 2010. "Laboratory Guide for Isolation and Characterization". Elsevier/Academic Press RNA Methodologies (4).

Femminella G.D., Ferrara N. and Rengo G. 2015. "The Emerging Role of microRNAs in Alzheimer's Disease.". *Frontiers in Physiology* 6(FEB): 1-5.

Filho J.C.M.R. and Kimura E.T. 2006. "MicroRNAs: Nova Classe de Reguladores Gênicos Envolvidos Na Função Endócrina E Câncer.". *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia* 50(6): 1102-7.

Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E. and Mello C.C. 1998. "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*.". *Nature* 391(6669): 806-11.

Gaugler J., James B., Johnson T., Scholz K. and Weuve J. 2017. "2017 Alzheimer's Disease Facts and Figures.". *Alzheimer's and Dementia* 12(4): 459-509.

Gomes M.J., Martins S., and Sarmiento B. 2015. "SRNAi as a Tool to Improve the Treatment of Brain Diseases: Mechanism, Targets and Delivery.". *Ageing Research Reviews* 21: 43-54.

Goodall E.F., Health P.R., Bandmann O., Kirby J. and Shaw P.J. 2013. "Neuronal Dark Matter: The Emerging Role of microRNAs in Neurodegeneration.". *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7(October): 1-16.

Grimm M., Mett J., Stahlmann C., Haupenthal V., Zimmer V. and Hartmann T. 2013. "Nepriylsin and AB Clearance: Impact of the APP Intracellular Domain in NEP Regulation and Implications in Alzheimer's Disease.". *Frontiers in Aging Neuroscience* 5(DEC): 1-27.

Guo J., Cheng J., North B.J. and Wei W. 2017. "Functional Analyses of Major Cancer-Related Signaling Pathways in Alzheimer's Disease Etiology.". *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* 1868(2): 341-58.

Hébert S.S., Horré K., Nicolăi L., Bergmans B., Papadopoulou A.S., Delacourte A. and Strooper B.D. 2009. "MicroRNA Regulation of Alzheimer's Amyloid Precursor Protein Expression.". *Neurobiology of Disease* 33(3): 422-28.

Hébert S.S., Korré K., Nicolăi L., Papadopoulou A.S., Mandemakers W., Silahatoglu A.N., Kauppinen S., Delacourte A. and Strooper B.D. 2008. "Loss of microRNA Cluster miR-29a/b-1 in Sporadic Alzheimer's Disease Correlates with Increased BACE1/beta-Secretase Expression.". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(17): 6415-20.

Holohan K.N., Lahiri D.K., Schneider B.P., Foroud T. and Saykin A.J. 2013. "Functional microRNAs in Alzheimer's Disease and Cancer: Differential Regulation of Common Mechanisms and Pathways.". *Frontiers in Genetics* 3(JAN): 1-16.

Hong H., Li Y. and Su B. 2017. "Identification of Circulating MiR-125b as a Potential Biomarker of Alzheimer's Disease in APP/PS1 Transgenic Mouse.". *Journal of Alzheimer's Disease* 59(4): 1449-58.

Hu X., Das B., Hou H., He W. and Yan R. 2018. "BACE1 Deletion in the Adult Mouse Reverses Preformed Amyloid Deposition and Improves Cognitive Functions.". *The Journal of Experimental Medicine* 215(3): 927-40.

Idda M.L., Munk R., Abdelmohsen K. and Gorospe M. 2018. "Noncoding RNAs in Alzheimer's Disease.". *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 9(2): 1-13.

Issler O. and Chen A. 2015. "Determining the Role of microRNAs in Psychiatric Disorders.". *Nature Reviews Neuroscience* 16(4): 201-12.

Jinek M. and Doudna J.A. 2009. "A Three-Dimensional View of the Molecular Machinery of RNA Interference.". *Nature* 457(January): 405-12.

Jucker M. and Walker L.C. 2013. "Self-Propagation of Pathogenic Protein Aggregates in Neurodegenerative Diseases.". *Nature* 501(7465): 45-51.

Khalil M.I., Foda B.M., Suresh S. and Singh U. 2015. "Technical Advances in Trigger-Induced RNA Interference Gene Silencing in the Parasite *Entamoeba Histolytica*". *International Journal for Parasitology*.

Kumar A., Singh A. and Ekavali. 2015. "A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management : An update.". *Pharmacol Reports*. 67(2): 195-203.

Lam J.K.W., Chow M.Y.T., Zhang Y. and Leung S.W.S. 2015. "SiRNA versus MiRNA as Therapeutics for Gene Silencing." *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 4(9): e252.

(a) Li S., Gao P., Wang L., Yan Y., Xia Y., Song J., Li H. and Yang J. 2017. "Osthole Stimulated Neural Stem Cells Differentiation into Neurons in an Alzheimer's Disease Cell Model via Upregulation of MicroRNA-9 and Rescued the Functional Impairment of Hippocampal Neurons in APP/PS1 Transgenic Mice." *Frontiers in Neuroscience* 11(JUN): 1-15.

(b) Li S., Zhang W. and Han W. 2017. "Initial Substrate Binding of γ -Secretase: The Role of Substrate Flexibility". *ACS Chemical Neuroscience* 8(6): 1279-1290.

MacFarlane L.A. and Murphy P.R. 2010. "MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer.". *Current Genomics* 11(7): 537-61.

- Maes O.C., Chertkow H.M., Wang E. and Schipper H.M. 2009. "MicroRNA: Implications for Alzheimer Disease and Other Human CNS Disorders.". *Current genomics* 10(3): 154-68.
- Masters C.L., Bateman R., Blennow K., Rowe C.C., Sperling R.A. and Jeffrey L.C. 2015. "Alzheimer's Disease.". *Nature Reviews Disease Primers* 1: 1-18.
- Menck C.F.M. 2010. "A Nova Grande Promessa Da Inovação Em Fármacos: RNA Interferência Saindo Do Laboratório Para a Clínica.". *Estudos Avançados* 24(70): 99-108.
- Müller M., Jäkel L., Bruinsma I.B., Claassen J.A., Kuiperij H.B. and Verbeek M.M. 2016. "MicroRNA-29a Is a Candidate Biomarker for Alzheimer's Disease in Cell-Free Cerebrospinal Fluid.". *Molecular Neurobiology* 53(5): 2894-99.
- Nalivaeva N.N. and Turner A.J. 2016. "AChE and the Amyloid Precursor Protein (APP) - Cross-Talk in Alzheimer's Disease.". *Chemico-Biological Interactions* 259: 301-6.
- O'Brien R.J. and Wong P.C. 2011. "Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer's Disease.". *Annual Review of Neuroscience* 34(1): 185-204.
- Pákási M. and Kálmán J. 2008. "Interactions between the Amyloid and Cholinergic Mechanisms in Alzheimer's Disease.". *Neurochemistry International* 53(5): 103-111.
- Pereira P., Queiroz J.A., Figueiras A. and Sousa F. 2017. "Current Progress on microRNAs-Based Therapeutics in Neurodegenerative Diseases." *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 8(3).
- Pereira P.A., Tomás J.F., Queiroz J.A., Figueiras A.R. and Sousa F. 2016. "Recombinant Pre-miR-29b for Alzheimer's Disease Therapeutics." *Scientific Reports* 6(1): 1-11.
- Pereira P., Sousa Â., Queiroz J., Correia I., Figueira A. and Sousa F. 2014. "Purification of Pre-miR-29 by Arginine-Affinity Chromatography.". *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 951-952(1): 16-23.
- Pernecky R., Alexopoulos P. and Kurz A. 2014. "Soluble Amyloid Precursor Proteins and Secretases as Alzheimer's Disease Biomarkers.". *Trends in Molecular Medicine* 20(1): 8-15.
- Pospich S. and Raunser S. 2017. "The Molecular Basis of Alzheimer's Plaques.". *Science*: 358(6359): 45-47.
- Puig K.L. and Combs C.K. 2013. "Expression and Function of APP and Its Metabolites Outside the Central Nervous System.". *Experimental Gerontology* 48(7): 608-11.

Reddy P.H., Williams J., Smith F., Bhatti J.S., Kumar S., Vijayan M., Kandimalla R., Kuruva C.S., Wang R., Manczak M., Yin X. and Reddy A.P. 2017. "A Critical Evaluation of Neuroprotective and Neurodegenerative MicroRNAs in Alzheimer's Disease.". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 483(4): 1156-65.

Reihaneh D., Rahmani F. and Rezaei N. 2017. "MicroRNA in Alzheimer's Disease Revisited: Implications for Major Neuropathological Mechanisms.". *Reviews in the neurosciences* 29(2): 161-182.

Ribeiro F.M., Camargos E.R.S., Souza L.C. and Teixeira A.L. 2013. "Animal Models of Neurodegenerative Diseases.". *Revista Brasileira de Psiquiatria* 35(suppl 2): S82-91.

Roshan R., Shridhar S., Sarangdhar M.A., Banik A., Chawla M., Garg M., Singh V.P. and Pillai B. 2014. "Brain-Specific Knockdown of miR-29 Results in Neuronal Cell Death and Ataxia in Mice.". *RNA* 20(8): 1287-97.

Schonrock N., Yazici K.D., Humphreys D., Staufenbiel M., Ittner L.M., Preiss T. and Götz J. 2010. "Neuronal MicroRNA Deregulation in Response to Alzheimer's Disease Amyloid- β ". *PLoS ONE* 5(6).

Shaik M.M., Tamargo I.A., Abubakar M.B., Kamal M.A., Greig N.H. and Gan S.H. 2018. "The Role of MicroRNAs in Alzheimer's Disease and Their Therapeutic Potentials.". *Genes*: 9(4).

Siomi H. and Siomi M.C. 2009. "On the Road to Reading the RNA-Interference Code.". *Nature* 457(January): 396-404.

Small G. and Bullock R. 2011. "Defining optimal treatment with cholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease.". *Alzheimers Dement.* 7(2): 177-184.

Strooper B.D., Iwatsubo T. and Wolfe M.S. 2012. "Presenilins and γ -Secretase: Structure, Function, and Role in Alzheimer Disease.". *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2(1): 1-19.

Su S.F., Chang Y.W., Vieyra C.A., Fang J.Y., Yang Z., Han B., Lee A.S. and Liang G. 2013. "MiR-30d, MiR-181a and MiR-199a-5p Cooperatively Suppress the Endoplasmic Reticulum Chaperone and Signaling Regulator GRP78 in Cancer.". *Oncogene* 32(39): 4694-4701.

Tan L., Yu J.T., Hu N. and Tan L. 2013. "Non-Coding RNAs in Alzheimer's Disease.". *Molecular Neurobiology* 47(1): 382-93.

Tang Y.P. and Gershon E.S. 2003. "Genetic Studies in Alzheimer's Disease.". *Dialogues in clinical neuroscience* 5(1): 17-26.

- Tsutsumi A., Kawamata T., Izumi N., Seitz H. and Tomari Y. 2011. "Recognition of the pre-miRNA structure by *Drosophila* Dicer-1.". *Nat Struct Mol Biol* 18(10):1153-8
- Van den Hove D.L., Kompotis K., Lardenoije R., Kenis G., Mill J., Steinbusch H.W., Lesch K.P., Fitzsimons C.P., Strooper B.D. and Rutten B.P.F. 2014. "Epigenetically Regulated microRNAs in Alzheimer's Disease.". *Neurobiology of Aging* 35(4): 731-45.
- Vingtdeux V., Sergeant N. and Buée L. 2012. "Potential Contribution of Exosomes to the Prion-like Propagation of Lesions in Alzheimer's Disease.". *Frontiers in Physiology* 3 JUL(July): 1-16.
- Wilkins H.M. and Swerdlow R.H. 2017. "Amyloid Precursor Protein Processing and Bioenergetics.". *Brain Research Bulletin* 133: 71-79.
- Willem M., Lammich S. and Haass C. 2009. "Function, Regulation and Therapeutic Properties of β -Secretase (BACE1)". *Seminars in Cell and Developmental Biology* 20(2): 175-82.
- Xu C. and Wang J. 2015. "Delivery Systems for siRNA Drug Development in Cancer Therapy.". *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 10(1): 1-12.
- Yang G., Song Y., Zhou X., Deng Y., Liu T., Weng G., Yu D. and Pan S. 2015. "MicroRNA-29c Targets β -Site Amyloid Precursor Protein-Cleaving Enzyme 1 and Has a Neuroprotective Role in Vitro and in Vivo.". *Molecular Medicine Reports* 12(2): 3081-88.
- Zhang Y., Thompson R., Zhang H. and Xu H. 2011. "APP Processing in Alzheimer's Disease.". *Molecular Brain* 4(1): 3.
- Zolezzi J.M., Candia S.B., Santos M.J. and Inestrosa N.C. 2014. "Alzheimer's Disease: Relevant Molecular and Physiopathological Events Affecting Amyloid-SS Brain Balance and the Putative Role of PPAR.". *Frontiers in Aging Neuroscience* 6(JUL): 1-12.