

Explorando padrões de expressão proteica em camundongos com síndrome de Down por meio de Análise Discriminante

Exploring protein expression patterns in mice with Down syndrome through Discriminant Analysis

¹Ilias De Musis, ²Kuang Hongyu, ³Fabiane de Lima Silva

¹ Graduando em Estatística – Universidade Federal de Mato Grosso (ilias.musis@gmail.com)

² Professor Doutor do Departamento de Estatística – Universidade Federal de Mato Grosso (prof.kuang@gmail.com)

³ Professora Doutora do Departamento de Estatística – Universidade Federal de Mato Grosso (fabiane.silva@ufmt.br)

RESUMO: A Síndrome de Down (SD) é a causa genética mais frequente de déficits de aprendizado e memória, e há um interesse crescente em tratamentos para essas deficiências cognitivas. O presente estudo tem como objetivo investigar a aplicabilidade da Análise Discriminante Canônica (ADC) na identificação das proteínas mais importantes para a diferenciação entre grupos de camundongos Ts65Dn, modelo genético da síndrome de Down, e grupos de controle, considerando fatores como genótipo, estímulo externo e tratamento com memantina. A ADC é uma técnica estatística multivariada que constrói funções discriminantes baseadas em variáveis preditoras de forma a proporcionar a melhor discriminação entre os grupos. Neste estudo, a ADC foi usada para identificar os padrões de expressão proteica que melhor discriminam entre grupos de camundongos. A ADC foi eficaz na discriminação de classes, identificando diferenças significativas entre camundongos estimulados e não estimulados a aprender. No entanto, não foi possível observar proteínas específicas associadas ao tratamento com memantina. As proteínas ITSN1, pERK e GSK3B destacaram-se na distinção entre camundongos com SD e selvagens, indicando seu potencial como marcadores para estudos futuros envolvendo as implicações cognitivas da SD.

Palavras Chave: Animal modelo. Deficiências cognitivas. Estatística multivariada. Memantina. Ts65Dn.

ABSTRACT: Down Syndrome (DS) is the most common genetic cause of learning and memory deficits, and there is growing interest in treatments for these cognitive disabilities. This study aims to investigate the applicability of Canonical Discriminant Analysis (CDA) in identifying the most important proteins in differentiating between groups of Ts65Dn mice, genetic model of DS, and control groups, considering factors such as genotype, external stimulus, and memantine treatment. CDA is a technique in multivariate statistics that creates discriminant functions based on predictor variables to provide the best discrimination between the groups. In this study, CDA was used to identify patterns of protein expression that best discriminate between mouse groups. CDA was effective in class discrimination, identifying significant differences between mice stimulated and those not stimulated to learn. However, it was not possible to identify specific proteins associated with memantine treatment. The proteins ITSN1, pERK, and GSK3B stood out in distinguishing between DS and wild mice, indicating their potential as markers for future studies involving the cognitive implications of DS.

Keywords: Animal model. Cognitive disabilities. Memantine. Multivariate statistics. Ts65Dn.

1. INTRODUÇÃO

A Síndrome de Down (SD) é uma alteração genética causada pela trissomia, definida como presença parcial ou integral, de três cópias do cromossomo humano 21 (Hsa21). Essa condição, além de causar uma variedade de sinais clínicos, constitui a causa genética mais frequente de déficits de aprendizado e memória (TOLEZANO *et al.*, 2020), presentes em todos os pacientes com a síndrome. Por esse motivo, existe um interesse considerável no desenvolvimento de soluções farmacológicas para o tratamento dos déficits cognitivos causados por SD.

Uma das hipóteses presentes é que as deficiências cognitivas da síndrome de Down seriam causadas pela expressão exagerada dos genes HSA21 e suas proteínas, causadas pela presença de um cromossomo extra.

Mais especificamente, Ermak e Davies (2003) sugeriram que a superexpressão do gene RCAN1 (Regulador de Calcineurina Tipo 1), que inibe a ação da calcineurina (CaN), poderia ser responsável na produção de sintomas similares à Doença de Alzheimer em indivíduos com SD. Procurando drogas que minimizem as perturbações observadas, se destacaram os receptores NMDA (N-metil D-Aspartato) pela sua performance na inibição da CaN, entre eles a memantina (COSTA; SCOTT-MCKEAN; STASKO, 2008).

Os modelos animais têm sido extremamente úteis no estudo de doenças genéticas, com camundongos sendo particularmente populares pela similaridade de seu genoma com o humano, entre outros fatores. Um exemplo é o camundongo Ts65Dn, extensivamente estudado como modelo da síndrome de Down. Ele carrega uma cópia extra de um segmento do cromossomo 16, cujos genes são homólogos aos do cromossomo 21 em humanos. De acordo com Sturgeon *et al.* (2012), experimentos com o modelo de camundongo Ts65Dn demonstraram diversas reações positivas de intervenções farmacológicas para o tratamento desses.

Com base nisso, os usos de memantina em camundongos Ts65Dn têm sido investigados para entender melhor o potencial deste medicamento em melhorar as deficiências cognitivas relacionadas à SD, mostrando, em muitos casos, resultados promissores (RUEDA *et al.*, 2010; SALAZAR, 2023). No entanto, é importante destacar que um número crescente de estudos tem apresentado argumentos contra a eficácia da memantina (COSTA *et al.*, 2022; OLIVEIRA; FARIA, 2022). Dessa forma, a aplicabilidade desse tratamento para os déficits cognitivos ligados à SD é um campo de constante evolução e estudo.

Na busca por entender os efeitos de diferentes variáveis, como o tratamento com memantina e outras possíveis intervenções farmacológicas, no tratamento de déficits relacionados à SD, é fundamental o emprego de técnicas estatísticas avançadas, como a análise multivariada. Dentre essas técnicas, para os propósitos do presente trabalho, se destaca a Análise Discriminante Canônica (ADC). Se trata de uma técnica que busca identificar combinações lineares de forma a maximizar a separação entre dois ou mais grupos, e pode ser particularmente útil para a identificação de diferenças entre grupos caso e controle, por exemplo.

O presente trabalho tem como objetivo verificar a aplicabilidade da técnica de ADC na identificação das proteínas mais importantes na discriminação entre grupos de camundongo com síndrome de Down e controles, levando em conta fatores como genótipo, estímulo externo e tratamento com memantina. Além disso, examinando as respostas proteicas em camundongos tratados com memantina, o estudo busca contribuir com a compreensão dos efeitos da droga no tratamento das deficiências cognitivas relacionadas à SD.

2. MATERIAIS E MÉTODO

2.1 Banco de dados

O conjunto de dados utilizado neste trabalho foi obtido por meio do site UCI Machine Learning Repository (DUA; GRAFF, 2019), um repositório de aprendizado de máquina que contém diversos dados de pesquisa. Esses dados foram fornecidos por Higuera, Gardiner e Cios (2015) e se tratam de um subconjunto do banco de dados originalmente analisado por Ahmed *et al.* (2015). O conjunto aborda a expressão proteica em camundongos geneticamente

modificados, com objetivo de investigar a relação entre a expressão de proteínas e condições de aprendizado em camundongos afetados por síndrome de Down.

Foram realizadas 15 medições de cada proteína por camundongo, sendo 34 camundongos trissômicos (Ts65Dn) e 38 do grupo controle. Com 77 proteínas e 72 roedores, a amostra total foi de 1080 medições. Além de genótipo, a amostra também foi dividida por estímulo, com alguns indivíduos recebendo estímulo externo para aprender, e por tratamento, com um grupo recebendo tratamento com memantina e um grupo-controle sendo injetado com salina. Assim, foram criadas 8 classes de camundongo baseadas nessas divisões, as quais podem ser visualizadas no Quadro 1.

Quadro 1 – Descrição das classes do conjunto de dados.

Classe	Descrição	Quantidade de indivíduos
c-CS-s	Camundongos selvagens, estimulados a aprender, injetados com salina	9
c-CS-m	Camundongos selvagens, estimulados a aprender, injetados com memantina	10
c-SC-s	Camundongos selvagens, não estimulados a aprender, injetados com salina	9
c-SC-m	Camundongos selvagens, não estimulados a aprender, injetados com memantina	10
t-CS-s	Camundongos trissômicos, estimulados a aprender, injetados com salina	7
t-CS-m	Camundongos trissômicos, estimulados a aprender, injetados com memantina	9
t-SC-s	Camundongos trissômicos, não estimulados a aprender, injetados com salina	9
t-SC-m	Camundongos trissômicos, não estimulados a aprender, injetados com memantina	9

O conjunto original contém 82 variáveis, resumidas no Quadro 2. Com o objetivo de otimizar a interpretação dos resultados obtidos, foi selecionado um subconjunto de 10 variáveis de proteínas como variáveis independentes no presente trabalho. Cada variável de expressão proteica foi escolhida de forma a representar suas similares, não incluídas na análise.

Essas 10 variáveis, junto da variável categórica referente às classes, foram utilizadas na aplicação da técnica de ADC, com intuito de determinar quais proteínas se destacam na diferenciação dos grupos.

Quadro 2 – Descrição das variáveis do estudo.

Número	Código	Descrição	Resposta
1	MouseID	Identificador único do roedor	Número de identificação única do roedor seguido do número da medição sendo realizada
2~78	[nome de cada proteína]	Valores relacionados à expressão das 77 proteínas	Valores contínuos
79	Genotype	Genótipo	<i>Control</i> (c): Grupo controle, camundongos selvagens <i>Ts65Dn</i> (t): Camundongo trissômico, modelo da Síndrome de Down
80	Treatment	Tratamento administrado	<i>Saline</i> (s): Grupo controle injetado com salina <i>Memantine</i> (m): Grupo tratamento injetado com memantina
81	Behavior	Estímulo ao aprendizado	<i>Shock-context</i> (SC): Grupo controle, não estimulado <i>Context-shock</i> (CS): Estimulado a aprender
82	class	Classe baseada na combinação das outras variáveis categóricas	c-CS-S, c-CS-M, c-SC-s, c-SC-m t-CS-s, t-CS-m, t-SC-s, t-SC-m

2.2 Análise Discriminante Canônica

A Análise Discriminante Canônica (ADC) se trata de uma técnica multivariada utilizada para determinar o relacionamento entre uma variável categórica e um conjunto de variáveis independentes métricas. Seus objetivos incluem verificar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre grupos previamente definidos (pela variável categórica) e identificar a contribuição relativa das p variáveis na separação desses (RENCHEER, 2002).

Nesse tipo de análise, combinações lineares, denominadas funções discriminantes canônicas, são formadas de forma a maximizar a diferenciação entre os grupos (HAIR *et al.*, 2010). Tendo que a variável categórica divide os dados em g populações, com n_i observações no i -ésimo grupo, a função discriminante é dada pela Equação 1:

$$z_{ij} = \mathbf{a}'\mathbf{y}_{ij} \quad (1)$$

em que $i = 1, 2, \dots, g$; $j = 1, 2, \dots, n_i$ e $\mathbf{a}' = [\alpha_1, \alpha_2, \dots, \alpha_p]$.

Seja o vetor de médias das populações comparadas denominado $\bar{\boldsymbol{\mu}}$, a matriz de covariância compartilhada entre elas $\boldsymbol{\Sigma}$ e $E(\mathbf{S}_{pl}) = \boldsymbol{\Sigma}$, a separação entre as médias \bar{z}_i , considerando 2 populações, é definida conforme Equação 2:

$$\frac{(\bar{z}_1 - \bar{z}_2)^2}{s_z^2} = \frac{\mathbf{a}'(\bar{\mathbf{y}}_1 - \bar{\mathbf{y}}_2)\mathbf{a}}{\mathbf{a}'\mathbf{S}_{pl}\mathbf{a}} \quad (2)$$

Segundo Rencher (2002), ao generalizar para g populações, devem ser utilizadas as matrizes indicadas nas Equações 3 e 4:

$$\mathbf{H} = \sum_{i=1}^g n_i (\bar{\mathbf{y}}_i - \bar{\mathbf{y}}_{..}) (\bar{\mathbf{y}}_i - \bar{\mathbf{y}}_{..})' \quad (3)$$

e

$$\mathbf{E} = \sum_{i=1}^g \sum_{j=1}^{n_i} (\mathbf{y}_{ij} - \bar{\mathbf{y}}_{i.}) (\mathbf{y}_{ij} - \bar{\mathbf{y}}_{i.})' \quad (4)$$

de forma que λ é definido de acordo com a Equação 5:

$$\lambda = \frac{\mathbf{a}'\mathbf{H}\mathbf{a}}{\mathbf{a}'\mathbf{E}\mathbf{a}} \quad (5)$$

Para obter a maior distância possível, é preciso maximizar o valor de \mathbf{a} . A equação pode ser reescrita conforme apresentado na Equação 6:

$$(\mathbf{E}^{-1}\mathbf{H} - \lambda\mathbf{I})\mathbf{a} = \mathbf{0}, \quad (6)$$

da qual podemos obter os autovalores λ e seus autovetores associados $\alpha_1, \alpha_2, \dots, \alpha_s$. Como $\lambda_1 > \lambda_2 > \dots > \lambda_s$, temos que a função discriminante com maior distância entre as médias, ou seja, que maior separa os grupos, se trata de $z_1 = \alpha_1'\mathbf{y}$, denominada de primeira amostra discriminante.

A partir dos s autovetores $\alpha_1, \alpha_2, \dots, \alpha_s$ encontrados, podem ser obtidas s funções discriminantes, $s \leq \min(g - 1, p)$ (JOHNSON; WICHERN, 2014).

As análises foram realizadas por meio do *software* R (R CORE TEAM, 2023), versão 4.2.3, utilizando como principais pacotes *vegan* (OKSANEN *et al.*, 2022) e *candisc* (FRIENDLY; FOX, 2021).

3. RESULTADOS/ DISCUSSÕES

As amostras utilizadas foram caracterizadas por 10 variáveis, referentes aos níveis de expressão das proteínas ITSN1, pAKT, pERK, CAMKII, GSK3B, JNK, MEK, BCL2, pCFOS e EGR1, a serem analisadas em função da variável categórica referente às classes. Primeiramente, foi aplicada uma Análise Multivariada da Variância (MANOVA) com teste de maior raiz de Roy (estatística de teste = 4,9465; $p < 2,2 \times 10^{-16}$), revelando diferenças significativas entre as médias das expressões proteicas, indicando diferença entre as classes.

A análise discriminante foi então aplicada para identificar as combinações lineares que mais discriminariam os grupos. Na Tabela 1 são apresentadas as 7 funções discriminantes canônicas geradas, seus associados autovalores, porcentagens e porcentagens acumuladas.

As duas primeiras funções discriminantes canônicas (FDC₁ e FDC₂) apresentaram variação acumulada de 86,54%. Conforme Cruz, Souza e Regazzi (2012), para garantia da confiabilidade e interpretação satisfatória dos resultados, as funções discriminantes analisadas devem englobar mais de 80% da variação acumulada. Assim, a variação encontrada é considerada elevada e permite explicar a variabilidade de maior parte das informações do conjunto de dados.

Tabela 1 – Teste multivariado Lambda de Wilks para as funções discriminantes canônicas.

Discriminante canônica	Correlação Canônica	Autovalor	Porcentagem (%)	Porcentagem acumulada (%)	p-valor
FDC ₁	0,9120	4,9465	64,7774	64,7770	$<2,2 \times 10^{-16}$
FDC ₂	0,7902	1,6620	21,7653	86,5430	$<2,2 \times 10^{-16}$
FDC ₃	0,5385	0,4084	5,3476	91,8900	$<2,2 \times 10^{-16}$
FDC ₄	0,5100	0,3516	4,6041	96,4940	$<2,2 \times 10^{-16}$
FDC ₅	0,3806	0,1694	2,2180	98,7120	$<2,2 \times 10^{-16}$
FDC ₆	0,2522	0,0679	0,8892	99,6020	$<1,216 \times 10^{-7}$
FDC ₇	0,1718	0,0304	0,3985	100,0000	0,0027

Pode ser observado que as 7 funções se acumulam para explicar 100% da variabilidade dos dados, e que a primeira função discriminante é a mais importante. A FDC₁ apresentou Correlação Canônica (CC) de 0,912 e explicou 65,7774% da variância total entre os grupos. A alta correlação canônica sugere que as variáveis examinadas estão fortemente associadas. A FDC₂, por sua vez, apresentou CC de 0,7902, explicando 21,7653% da variância dos dados.

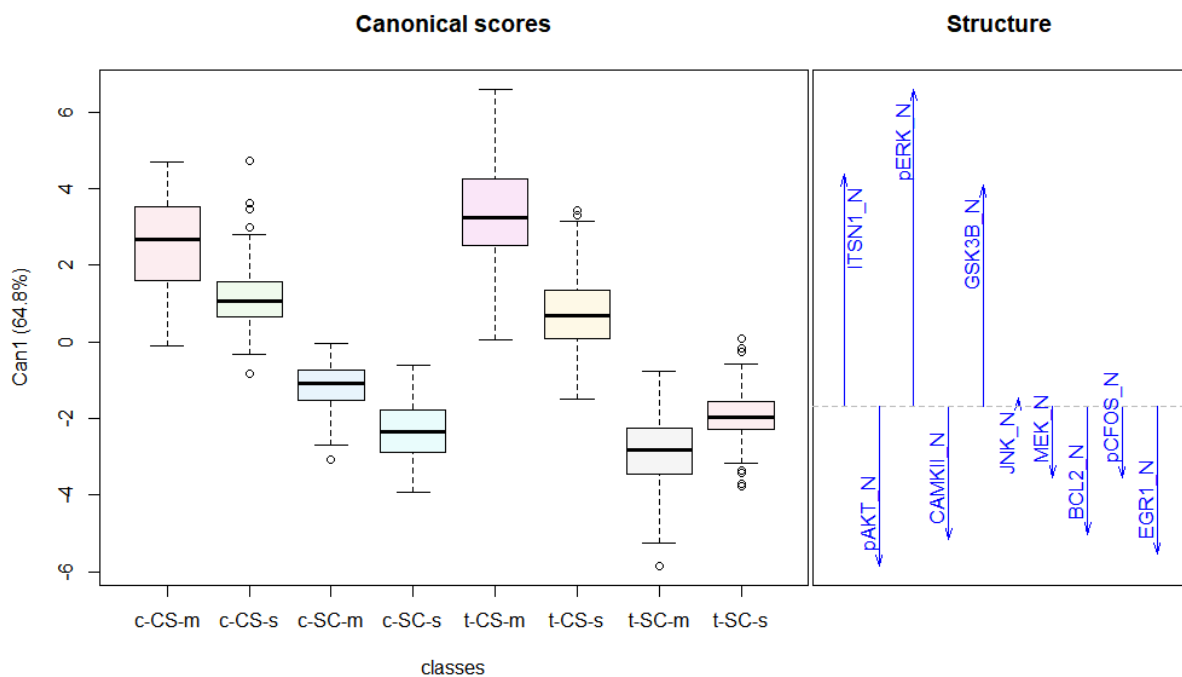
Observando os coeficientes canônicos das 2 funções (Tabela 2), tem-se que as variáveis que mais contribuíram de forma positiva com a FDC₁ foram aquelas associadas às proteínas JNK, GSK3B e pERK, com escores de 1,5773, 1,0709 e 1,0596 respectivamente, contrastando com MEK e CAMKII, com escores negativos de -1,3334 e -1,1514, respectivamente. Na FDC₂, a proteína que mais contribuiu na discriminação entre as classes foi ITSN1, com escore negativo de -2,5586.

Tabela 2 – Coeficientes canônicos (CC) das duas primeiras funções discriminantes canônicas.

Variáveis	FDC ₁	FDC ₂
ITSN1_N	-0,5614	-2,5586
pAKT_N	-0,2541	-0,9889
pERK_N	1,0596	0,9613
CAMKII_N	-1,1514	0,4689
GSK3B_N	1,0709	1,1177
JNK_N	1,5773	-0,3825
MEK_N	-1,3334	0,9396
BCL2_N	0,1422	-0,2943
pCFOS_N	-0,0762	0,1145
EGR1_N	0,2471	0,1574

Para um entendimento mais aprofundado, a Figura 1 oferece uma visualização mais detalhada das interações entre as proteínas e suas respectivas contribuições para a função discriminante canônica. Observa-se nessa o *boxplot* da dispersão dos scores canônicos referentes à primeira função discriminante canônica, referente a 64,7774% da variabilidade dos dados. É possível notar as proteínas ITSN1, pERK e GSK3B se destacando em módulo e em contraste com todas as outras variáveis. Foi possível discriminar entre todas as classes de camundongos trissômicos e camundongos selvagens com as variáveis escolhidas, com algumas sobreposições ao comparar os dois grupos. Os grupos de camundongos com e sem SD são mais facilmente diferenciados ao considerar a FDC_2 , como pode ser observado na Figura 2.

Figura 1 – Gráficos *boxplot* dos escores relacionados à FDC_1 e gráfico de vetores representando a influência das variáveis na discriminação das classes.



Apresentando destaque na segunda função discriminante, a proteína ITSN1 possui um papel importante no fenótipo da Síndrome de Down (DERGAI *et al.*, 2010), com sua superexpressão potencialmente afetando a dinâmica de outros complexos proteicos (GUIPPONI *et al.*, 1998). De forma similar, a proteína pERK se mostrou fortemente associada à síndrome de Down em estudos recentes, ressaltando sua relevância nessa condição (LANZILLOTTA *et al.*, 2021). A atividade da proteína GSK3B, por sua vez, foi destacada como influente nas deficiências neurais que caracterizam a síndrome de Down, conforme evidenciado por Trazzi *et al.* (2014). Dessa forma, o destaque dessas proteínas na discriminação de grupos, como apresentado na Figura 1, encontra respaldo em diversas pesquisas no campo.

A Figura 2 apresenta o *biplot* canônico, com eixos referentes às funções discriminantes, sendo Can1 referente a FDC_1 e Can2 referente a FDC_2 , respectivamente. É possível notar que as proteínas ITSN1 e pERK possuem maiores módulos, indicando grande

influência em seu quadrante, que contém as classes t-CS-s e t-CS-m. Ambas se referem a grupos de camundongos trissômicos e estimulados a aprender, se diferenciando pelo tratamento ou não com memantina. Já a classe t-CS-m, de camundongos pertencentes aos 3 grupos de tratamento (por genótipo, comportamento e medicamento administrado), se encontrou mais à direita, distanciando-se das outras. GSK3B foi a proteína mais próxima dessa, com pERK e ITSN1 também exercendo grande influência.

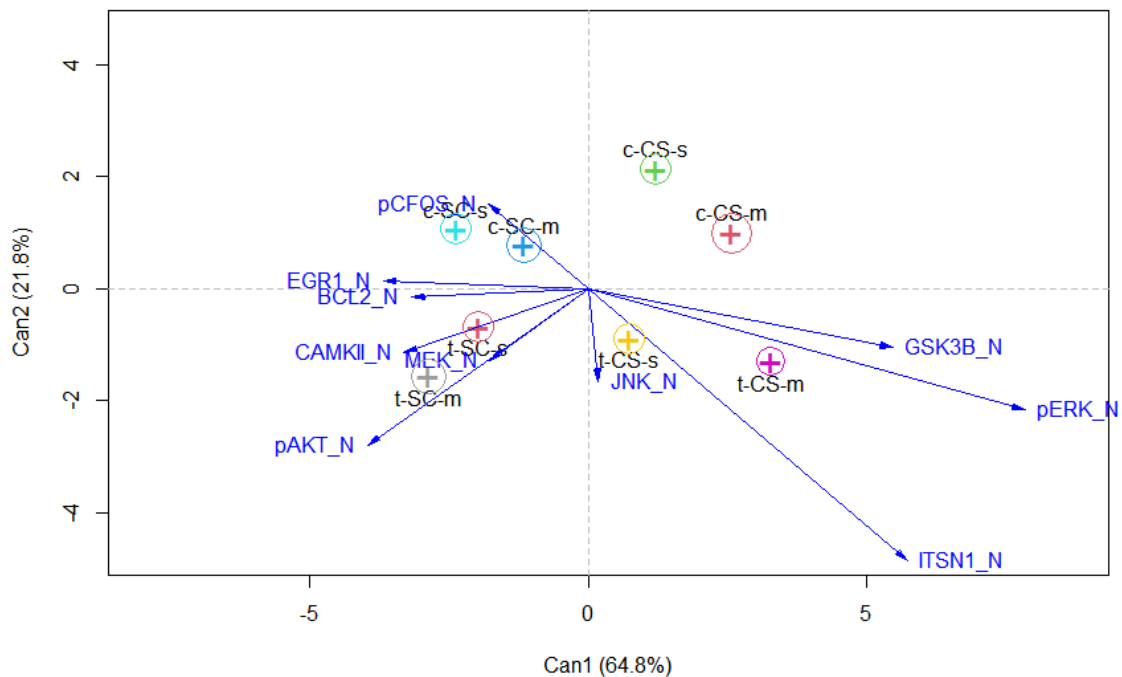
Todas as classes de camundongos trissômicos (t-SC-m, t-SC-s, t-CS-m, t-CS-s) tenderam a valores negativos na segunda função discriminante. Com o oposto valendo para os camundongos selvagens (c-SC-s, c-SC-m, c-CS-s, c-CS-m), esses grupos foram discriminados com sucesso. A proteína que aparentemente mais contribuiu com as classes c-SC-s e c-SC-m e que aparenta mais similar a elas entre as analisadas foi a pCFOS.

Outra distinção apresentada no *biplot* é que todas as classes referentes a camundongos estimulados a aprender (c-CS-s, c-CS-m, t-CS-s, t-CS-m) se concentraram na direita do gráfico, associando-se a valores positivos na FDC_1 , com o oposto sendo válido ao grupo controle dessa característica, não estimulado a aprender.

As classes c-CS-s e c-CS-m, referente aos camundongos selvagens e estimulados a aprender, se mostraram isoladas, sem proteínas fortemente relacionadas. É importante notar que estão claramente diferenciadas das classes c-SC-s e c-SC-m, de mesmas características, porém sem estímulo externo a aprender. Os resultados da análise realizada por Ahmed *et al.* (2015) corroboram essas observações, afirmando que o tratamento com memantina em camundongos não trissômicos não foi eficaz. Pelo contrário, o tratamento pareceu piorar a condição desses.

Cada classe referente ao tratamento com memantina se encontrou no mesmo quadrante que sua contraparte controle, injetada com salina. A discriminação desse tratamento se mostrou mais difícil entre outras características, em relação as proteínas escolhidas.

Figura 2 – Biplot da análise discriminante canônica das expressões proteicas medidas em relação às classes caso-controle dos camundongos.



4. CONCLUSÃO/ CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise discriminante canônica foi eficaz na discriminação de classes para esse conjunto de dados. Foi possível visualizar diferenças significativas entre camundongos estimulados e não estimulados externamente a aprender, indicando que esse estímulo tem efeitos nas expressões proteicas e reforçando a aplicabilidade da ADC para este tipo de análise.

Não se observou proteínas associadas especificamente ao tratamento ou não com memantina. Pode ser necessário adicionar mais variáveis na análise, ou realizar outros tipos de análises multivariadas complementares.

As proteínas ITSN1, pERK e GSK3B se destacaram na distinção entre camundongos com SD e selvagens e entre comportamentos, e podem ser importantes marcadores potenciais para estudos futuros envolvendo implicações cognitivas da SD.

5. REFERÊNCIAS

AHMED, M. M.; DHANASEKARAN, A. R.; BLOCK, A.; TONG, S.; COSTA, A. C. S.; STASKO, M.; GARDINER, K. J. Protein Dynamics Associated with Failed and Rescued Learning in the Ts65Dn Mouse Model of Down Syndrome. **PLOS ONE**, USA, v. 10, n. 3, 2015. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0119491>>. Acesso em: 22 abr. 2023.

COSTA, A. C. S.; BRANDÃO, A. C.; BOADA, R.; BARRIONUEVO, V. L.; TAYLOR, H. G.; ROTH, E.; STASKO, M. R.; JOHNSON, M. W.; ASSIR, F. F.; ROBERTO, M. P.; SALMONA, P.; ABREU-SILVEIRA, G.; BEDERMAN, I.; PRENDERGAST, E.; HÜLS, A.; ABRISHAMCAR, S.; MUSTACCHI, Z.; SCHEIDEMANTEL, T.; ROIZEN, N. J.; RUEDRICH, S. Safety, efficacy, and tolerability of memantine for cognitive and adaptive outcome measures in adolescents and young adults with Down syndrome: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 trial. **The Lancet Neurology**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 31–41, 2022. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1474442221003690>>. Acesso em: 3 jun. 2023.

COSTA, A. C. S.; SCOTT-MCKEAN, J. J.; STASKO, M. R. Acute Injections of the NMDA Receptor Antagonist Memantine Rescue Performance Deficits of the Ts65Dn Mouse Model of Down Syndrome on a Fear Conditioning Test. **Neuropsychopharmacology**, CO, USA, v. 33, n. 7, p. 1624–1632, 2008.

CRUZ, C. D.; SOUZA, P. C.; REGAZZI, A. J. **Modelos Biométricos Aplicados Ao Melhoramento Genéticos**. 4. ed. [S. l.]: Editora UFV, 2012.

DERGAI, O.; NOVOKHATSKA, O.; DERGAI, M.; SKRYPKINA, I.; TSYBA, L.; MOREAU, J.; RYNDITCH, A. Intersectin 1 forms complexes with SGIP1 and Repl1 in clathrin-coated pits. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 402, n. 2, p. 408–413, 2010. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X10019078>>. Acesso em: 3 jun. 2023.

DUA, D.; GRAFF, C. **UCI Machine Learning Repository**. Irvine, CA, 2019. Disponível em: <<http://archive.ics.uci.edu/ml>>. Acesso em: 1 abr. 2023.

ERMAK, G.; DAVIES, K. DSCR1(Adapt78) --A Janus Gene Providing Stress Protection but Causing Alzheimer's Disease? **IUBMB Life (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life)**, Los Angeles, CA, USA, v. 55, n. 1, p. 29–31, 2003.

FRIENDLY, M.; FOX, J. Candisc: Visualizing Generalized Canonical Discriminant and Canonical Correlation Analysis. [S. l.], 2021. Disponível em: <<https://CRAN.R-project.org/package=candisc>>. Acesso em: 18 abr. 2023.

GUIPPONI, M.; SCOTT, H. S.; CHEN, H.; SCHEBESTA, A.; ROSSIER, C.; ANTONARAKIS, S. E. Two Isoforms of a Human Intersectin (ITSN) Protein Are Produced by Brain-Specific Alternative Splicing in a Stop Codon. **Genomics**, [s. l.], v. 53, n. 3, p. 369–376, 1998. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0888754398955215>>. Acesso em: 3 jun. 2023.

HAIR, J. F.; BLACK, W. C.; BABIN, B. J.; ANDERSON, R. E. **Multivariate data analysis**. 7. ed. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall, 2010.

HIGUERA, C.; GARDINER, K. J.; CIOS, K. J. Self-Organizing Feature Maps Identify Proteins Critical to Learning in a Mouse Model of Down Syndrome. **PLOS ONE**, France, v. 10, n. 6, 2015. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0129126>>. Acesso em: 22 abr. 2023.

JOHNSON, R. A.; WICHERN, D. W. **Applied multivariate statistical analysis**. 6. ed. Harlow: Pearson Education Limited, 2014. (Always learning).

LANZILLOTTA, C.; ZULIANI, I.; TRAMUTOLA, A.; BARONE, E.; BLARZINO, C.; FOLGIERO, V.; CAFORIO, M.; VALENTINI, D.; VILLANI, A.; LOCATELLI, F.; BUTTERFIELD, D. A.; HEAD, E.; PERLUIGI, M.; ABISAMBRA, J. F.; DI DOMENICO, F. Chronic PERK induction promotes Alzheimer-like neuropathology in Down syndrome: Insights for therapeutic intervention. **Progress in Neurobiology**, [s. l.], v. 196, p. 101892, 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301008220301477>>. Acesso em: 3 jun. 2023.

OKSANEN, J.; SIMPSON, G. L.; BLANCHET, F. G.; KINDT, R.; LEGENDRE, P.; MINCHIN, P. R.; O'HARA, R. B.; SOLYMOS, P.; STEVENS, M. H. H.; SZOECIS, E.; WAGNER, H.; BARBOUR, M.; BEDWARD, M.; BOLKER, B.; BORCARD, D.; CARVALHO, G.; CHIRICO, M.; DE CACERES, M.; DURAND, S.; EVANGELISTA, H. B. A.; FITZJOHN, R.; FRIENDLY, M.; FURNEAUX, B.; HANNIGAN, G.; HILL, M. O.; LAHTI, L.; MCGLINN, D.; OUELLETTE, M.-H.; CUNHA, E. R.; SMITH, T.; STIER, A.; TER BRAAK, C. J. F.; WEEDON, J. **Vegan: Community Ecology Package**. [S. l.], 2022. Disponível em: <<https://CRAN.R-project.org/package=vegan>>. Acesso em: 18 abr. 2023.

OLIVEIRA, L. C. D.; FARIA, D. D. P. Pharmacological Approaches to the Treatment of Dementia in Down Syndrome: A Systematic Review of Randomized Clinical Studies. **Molecules**, [s. l.], v. 27, n. 10, p. 3244, 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1420-3049/27/10/3244>>. Acesso em: 3 jun. 2023.

R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2023. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>. Acesso em: 18 abr. 2023.

RENCHER, A. C. **Methods of multivariate analysis**. 2. ed. New York: J. Wiley, 2002.

RUEDA, N.; LLORENS-MARTÍN, M.; FLÓREZ, J.; VALDIZÁN, E.; BANERJEE, P.; TREJO, J. L.; MARTÍNEZ-CUÉ, C. Memantine Normalizes Several Phenotypic Features in the Ts65Dn Mouse Model of Down Syndrome. **Journal of Alzheimer's Disease**, Santander, Spain, v. 21, n. 1, p. 277–290, 2010.

STURGEON, X.; LE, T.; AHMED, M. M.; GARDINER, K. J. **Pathways to cognitive deficits in Down syndrome**. *Em: PROGRESS IN BRAIN RESEARCH*. Denver, CO, USA: Elsevier, 2012. v. 197, p. 73–100. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444542991000054>>. Acesso em: 4 abr. 2023.

TOLEZANO, G. C.; CARVALHO, L. M. L.; KREPISCHI, A. C. V.; ROSENBERG, C. Inteligência e deficiência intelectual: bases genéticas e fatores ambientais. **Genética na Escola**, São Paulo, v. 15, n. 1, p. 18–25, 2020.

TRAZZI, S.; FUCHS, C.; DE FRANCESCHI, M.; MITRUGNO, V. M.; BARTESAGHI, R.; CIANI, E. APP-dependent alteration of GSK3 β activity impairs neurogenesis in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. **Neurobiology of Disease**, [s. l.], v. 67, p. 24–36, 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969996114000576>>. Acesso em: 3 jun. 2023.



O conteúdo deste trabalho pode ser usado sob os termos da licença Creative Commons Attribution 4.0. Qualquer outra distribuição deste trabalho deve manter a atribuição ao(s) autor(es) e o título do trabalho, citação da revista e DOI.