

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

FELIPE JAMES DE ALMEIDA VASQUEZ

**EXPLORANDO O PAPEL DOS RNAs LONGOS NÃO
CODIFICADORES NA DOENÇA DE ALZHEIMER**

RIBEIRÃO PRETO - SP

2022

FELIPE JAMES DE ALMEIDA VASQUEZ

EXPLORANDO O PAPEL DOS RNAs LONGOS NÃO
CODIFICADORES NA DOENÇA DE ALZHEIMER

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Genética

Orientadora: Profa. Dra. Silvana Giuliatti

Coorientador: Prof. Dr. Willian Orlando Castillo Ordóñez

RIBEIRÃO PRETO - SP

2022

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE A CITADA FONTE.

Assinatura: _____ Data: ___/___/_____

FICHA CATALOGRÁFICA

James de Almeida Vasquez, Felipe

Explorando o papel dos RNAs longos não codificadores na Doença de Alzheimer. / Felipe James de Almeida Vasquez; Coorientador: Willian Orlando Castillo Ordoñez; Orientadora: Silvana Giuliatti. – Ribeirão Preto, 2022.

119 p.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Genética; Coorientador: Orlando Castillo Ordóñez, Willian; Orientadora: Giuliatti, Silvana.

1. lncRNAs. 2. Doença de Alzheimer. 3. Bioinformática.

NOME: Felipe James de Almeida Vasquez

TÍTULO: Explorando o papel dos RNAs longos não codificadores na Doença de Alzheimer.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: ____/____/____

Banca examinadora

Orientador: Prof(a). Dr(a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a): _____ Instituição: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a): _____ Instituição: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a): _____ Instituição: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

Este projeto bem como sua apresentação em congressos foi realizado com apoio financeiro das seguintes instituições e entidades:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq
- Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência – FAEPA
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP-USP

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à minha mãe, por todo o incentivo, apoio e carinho em minha caminhada durante o mestrado e por toda a vida. Ao meu pai, pelo companheirismo e suporte. Aos meus irmãos, que ajudaram a tornar a caminhada mais leve e sempre estiveram ao meu lado. À minha avó, Cecília, que sempre me auxiliou em tudo que estivesse ao seu alcance.

À minha família, que sempre torceram por mim. Especialmente ao meu avô, Mário Segundo, que veio a falecer no ano de 2021, chileno de grande coração, sempre me apoiou em todas as decisões difíceis e sei que sempre vai me apoiar, não importa onde esteja.

À Renata, minha companheira, por estar sempre ao meu lado, me apoiando em todas as decisões, e por toda a compreensão, companheirismo e carinho que tem me dedicado.

Ao meu tio Tomás e minha tia Vanessa, que me apoiaram em todas as maneiras possíveis para concretizar meus sonhos, servindo de grandes exemplos para mim.

À professora Silvana Giuliatti, por ter me recebido de portas abertas e pela orientação durante a realização deste projeto.

Aos meus companheiros de laboratório do GBi, que me ajudaram durante a caminhada durante o mestrado, mesmo todos estando longe devido a pandemia da COVID-19.

À Profa. Dra. Aparecida Maria Fontes, ao Prof. Dr. Jeremy Andrew Squire e ao Dr. Diego Luis Ribeiro pelas contribuições no exame de qualificação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Um agradecimento especial à Susie, por toda a ajuda.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado e apoio financeiro para realização do projeto.

A todos que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

RESUMO

VASQUEZ, F. J. A. **Explorando o papel dos RNAs longos não codificadores na Doença de Alzheimer**. 2022. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Introdução: A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa que afeta a memória, o raciocínio e o comportamento, afetando principalmente pessoas com 65 anos ou mais. O crescimento exponencial de pessoas que atingem idades avançadas tem aumentado os casos de DA, por isso, a busca pela cura tem sido feita exaustivamente. Nos últimos anos, RNAs longos não codificadores (lncRNAs) têm sido relatados como tendo um papel ativo na DA. Mais de 300 lncRNAs apresentam expressão desregulada em pacientes com DA. Dentre esses lncRNAs, quatro foram escolhidos para o projeto: BACE1-AS, 51A, 17A e NDM29. Os lncRNAs possuem relação com uma patogênese de DA e estão superexpressos. Entretanto, para que haja uma total compreensão de seus papéis e para que novos tratamentos possam ser propostos, suas estruturas e relação com seus alvos devem ser bem compreendidos. Além de seu mecanismo principal, BACE1-AS possui uma função de sequestro de miRNAs por meio de seu mecanismo RNA endógeno competidor (ceRNA), evitando o silenciamento de mRNA BACE1, e aumentando a produção de peptídeos A β . Esse mecanismo ceRNA ainda não foi analisado nos lncRNAs restantes. A análise da interação miRNA-lncRNA-mRNA pode colaborar na compreensão dos lncRNAs, fornecendo informações relevantes sobre os lncRNAs.

Objetivo: Utilizar métodos computacionais para a predição das estruturas dos lncRNAs e buscar suas interações com miRNAs, agregando conhecimento sobre seus papéis na DA e suas funções como ceRNAs. **Metodologia:** As modelagens foram realizadas por meio das ferramentas Mfold, para predição das estruturas secundárias, e 3dRNA, para predição das estruturas terciárias. Para a predição de miRNAs, foram utilizadas as ferramentas TarBase v.8, lncBase v.3, TargetScanHuman, mirSystem e miRDB. O software HNADOCK foi utilizado para realizar as interações entre as estruturas terciárias de lncRNAs e miRNAs. **Resultados:** Foram modeladas 66 estruturas secundárias e as selecionadas para análises foram as estruturas com menor energia livre mínima (MFE). Para as estruturas 3D, foram obtidas 10 estruturas para cada lncRNA. As selecionadas para análise foram as que possuem o menor MFE e semelhança com a estrutura secundária. Após a modelagem, foram realizadas predições de miRNAs que afetam os lncRNAs e os genes alvos. Foram encontrados 17 miRNAs que se pareiam com BACE1-AS e BACE1. Para os lncRNAs 51A, 17A e NDM29 foram encontrados 2 miRNAs para 51A e miRNA para 17A. Até o momento não há estudos relacionando esses miRNAs com os lncRNAs. Os miRNAs que demonstraram interações estáveis com o BACE1-AS são hsa-miR-625-5p, hsa-miR-382-5p, hsa-miR-1226-3p, hsa-miR-130a-3p e hsa-miR-196b-5p. Os miRNAs que interagiram com a estrutura 3D de 51A possuem interações estáveis. O miRNA que interagiu com 17A não possui estabilidade suficiente para ocorrer o sequestro. Para NDM29 não foi encontrado nenhum miRNA, descartando a possibilidade de ser um ceRNA. **Conclusão:** A regulação positiva dos lncRNAs é um potencial indicador de DA. As estruturas 3D modeladas podem contribuir na busca de terapias e com a predição de miRNAs, os sítios encontrados possibilitam o silenciamento dos lncRNAs com miRNAs e fármacos, para minimizar a ação desses lncRNAs, possuindo grande potencial como estratégia terapêutica para DA.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer, epigenética, modelagem molecular, bioinformática.

ABSTRACT

VASQUEZ, F. J. A. **Exploring the role of long non-coding RNAs in Alzheimer's Disease.**

2022. Dissertation (Master's degree) - Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Introduction: Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disease that affects memory, reasoning, and behavior, mainly affecting people aged 65 and over. The exponential growth of people reaching advanced ages has increased the cases of AD, hence, the search for a cure has been done exhaustively. In recent years, long non-coding RNAs (lncRNAs) have been reported to play an active role in AD. More than 300 lncRNAs presented deregulated expression. Among these lncRNAs, four were chosen for the project: BACE1-AS, 51A, 17A, and NDM29. The lncRNAs are related to AD pathogenesis and are overexpressed. However, for a complete understanding of their roles and for new treatments to be proposed, their structures and relationship with their targets must be well understood. In addition to its main mechanism, BACE1-AS has the function of sequestering miRNAs through its competing endogenous RNA (ceRNA) mechanism, preventing the silencing of BACE1 mRNA, and increasing the production of A β peptides. This ceRNA mechanism has not yet been analyzed in the remaining lncRNAs. The analysis of the miRNA-lncRNA-mRNA interaction can contribute to the understanding of lncRNAs, providing relevant information about them.

Objective: Use computational methods to predict the structures of lncRNAs and search for their interactions with miRNAs, adding knowledge about their roles in AD and their functions as ceRNAs. **Methodology:** Modeling was performed using Mfold tools, for predicting secondary structures, and 3dRNA, for predicting tertiary structures. For the prediction of miRNAs, the tools TarBase v.8, lncBase v.3, TargetScanHuman, mirSystem, and miRDB were used. The HNADOCK software was used to perform the interactions between the tertiary structures of lncRNAs and miRNAs. **Results:** 66 secondary structures were modeled and those selected for analysis were the structures with the lowest minimum free energy (MFE). For the 3D structures, 10 structures were obtained for each lncRNA. Those selected for analysis were those with the lowest MFE and similarities with the secondary structure. After modeling, predictions of miRNAs that affect lncRNAs and target genes were performed. We found 17 miRNAs that paired with BACE1-AS and BACE1. For lncRNAs 51A, 17A, and NDM29, 2 miRNAs for 51A and miRNA for 17A were found. To date, there are no studies relating these miRNAs to lncRNAs. The miRNAs that demonstrated stable interactions with BACE1-AS are hsa-miR-625-5p, hsa-miR-382-5p, hsa-miR-1226-3p, hsa-miR-130a-3p and hsa-miR-196b-5p. The miRNAs that interacted with the 3D structure of 51A have stable interactions. The miRNA that interacted with 17A does not have sufficient stability for sequestration to occur. No miRNA was found for NDM29, discarding the possibility of being a ceRNA **Conclusion:** Upregulation of lncRNAs is a potential indicator of AD. The 3D-modeled structures can contribute to the search for therapies and with the prediction of miRNAs, the sites found allow the silencing of lncRNAs with miRNAs and drugs, to minimize the action of these lncRNAs, having great potential as a therapeutic strategy for AD.

Keywords: Alzheimer's disease, epigenetics, molecular modeling, bioinformatics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Gráfico de prevalência de DA nos EUA.	19
Figura 2 - Vias de processamento de APP.	21
Figura 3 - Esquema da proteólise da tau e sua contribuição para a patogênese da tauopatia.....	23
Figura 4 - Categorias de RNAs longos não codificadores	28
Figura 5 - BACE1-AS aumenta a produção de BACE1 e peptídeos A β	31
Figura 6 - Representação da estrutura secundária.	39
Figura 7 - Um resumo do dobramento de RNA e estrutura de RNA 3D.	40
Figura 8 - Elementos secundários montados em estruturas 3D.....	43
Figura 9 - Estrutura secundária e h-num do lncRNA BACE1-AS.....	51
Figura 10 - Estrutura secundária com elementos secundários coloridos.....	52
Figura 11 - Estrutura secundária e h-num do lncRNA 51A.....	54
Figura 12 - Estrutura secundária do 51A com elementos secundários coloridos.....	55
Figura 13 - Estrutura secundária e h-num do lncRNA 17A.	56
Figura 14 - Estrutura secundária do 17A com elementos secundários coloridos.....	57
Figura 15 - Estrutura secundária e h-num do lncRNA NDM29.....	59
Figura 16 - Estrutura secundária do NDM29 com elementos secundários coloridos	60
Figura 17 - Gráfico de comparação dos valores de energia das estruturas terciárias de BACE1-AS. .	61
Figura 18 - Estrutura 3D de BACE1-AS em diferentes ângulos.....	62
Figura 19 - Gráfico de comparação dos valores de energia das estruturas terciárias de 51A.	63
Figura 20 - Estrutura 3D do 51A em diferentes ângulos.....	64
Figura 21 - Gráfico de comparação dos valores de energia das estruturas terciárias de 17A	65
Figura 22 - Estrutura 3D do 17A em diferentes ângulos.....	66
Figura 23 - Gráfico de comparação dos valores de energia das estruturas terciárias de NDM29	67
Figura 24 - Estrutura 3D do NDM29 em diferentes ângulos	68
Figura 25 - Locais de interação de miRNAs na estrutura secundária de BACE1-AS.....	70
Figura 26 - Locais de interação de miRNAs na estrutura 3D de BACE1-AS	71
Figura 27 - Locais de ligação de miRNAs na estrutura secundária de 51A.....	73
Figura 28 - Locais de ligação de miRNAs na estrutura 3D de 51A	73
Figura 29 - Locais de ligação de miRNAs na estrutura secundária de 17A.....	75
Figura 30 - Locais de ligação de miRNAs na estrutura 3D de 17A	75
Figura 31 - Estruturas 3D dos miRNA interagindo com BACE1-AS.....	80
Figura 32 - Estruturas 3D dos miRNA interagindo com 51A.....	83
Figura 33 - Estruturas 3D dos miRNA interagindo com 17A.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação das estruturas secundárias do BACE1-AS	48
Tabela 2 - Classificação de energias das estruturas secundárias do 51A	53
Tabela 3 - Classificação de energias das estruturas secundárias do 17A	55
Tabela 4 - Classificação de energias das estruturas secundárias do NDM29.....	57
Tabela 5 - MicroRNAs que interagem com BACE1 e BACE1-AS	69
Tabela 6 - MicroRNAs que interagem com 51A e SORL1.....	72
Tabela 7 - MicroRNAs que interagem com 17A e GABAB2	74
Tabela 8 - MicroRNAs que interagem com NDM29	76
Tabela 9 - Interações das estruturas 3D de BACE1-AS e miRNAs.....	77
Tabela 10 - Interações das estruturas 3D de 51A e miRNAs	81
Tabela 11 - Interações das estruturas 3D de 17A e miRNAs	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A β	Peptídeos beta-amiloides
A β 40	Produto proteolítico de 40 aminoácidos da APP
A β 42	Produto proteolítico de 42 aminoácidos da APP
APLPs	Proteínas semelhantes a APP
APP	Proteína precursora amilóide
APOE2	Apolipoproteína E2
APOE2	Apolipoproteína E2
APOE4	Apolipoproteína E4
BACE1	Proteína beta-secretase 1
ceRNA	RNA endógeno competidor
CNS	Sistema nervoso central
DA	Doença de Alzheimer.
EOAD	Doença de Alzheimer precoce
FAD	Doença de Alzheimer familiar
FDA	Food & Drug Administration
LCR	Tomografia por emissão de pósitrons
lncRNAs	Long non coding RNAs
LOAD	Doença de Alzheimer de início tardio
mRNA	RNA mensageiro
miRNAs	MicroRNAs.
MMSE	Mini Mental State Examination
MREs	Elementos de resposta mútua de microRNAs
ncRNA	Non coding RNA
NFTs	Emaranhados neurofibrilares
NMDA	Receptor N-metil-d-aspartato
PET	Líquido cefalorraquidiano
piRNA	RNAs de interação com Piwi (piRNA)
PrPSc	Proteína prião
PSEN1	Presenilina 1
PSEN2	Presenilina 2
SAD	Doença de Alzheimer esporádica

siRNA	Pequeno RNA de interferencia
snRNA	Pequeno RNA nuclear
snoRNA	Pequeno RNA nucleolar
SORL1	Receptor neuronal relacionado à sortilina
SSEs	Pequenos elementos secundários

LISTA DE SÍMBOLOS

°C Graus celsius

kcal/mol Quantidade de energia por número de moléculas, átomos ou outras partículas semelhantes

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. A DOENÇA DE ALZHEIMER	15
1.2. TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER	17
1.3. PREVALÊNCIA DA DOENÇA DE ALZHEIMER	18
1.4. PRINCIPAIS PATOGÊNESES DA DOENÇA DE ALZHEIMER	19
1.4.1. Hipótese da cascata amiloide	19
1.4.2. Hiperfosforilação da proteína tau	22
1.4.3. Neuroinflamação	24
1.5. EPIGENÉTICA NA DOENÇA DE ALZHEIMER	25
1.5.1. RNAs longos não codificadores (lncRNAs)	27
1.6. LNCRNAs RELACIONADOS COM A DOENÇA DE ALZHEIMER	29
1.6.1. LncRNA BACE1-AS	30
1.6.2. LncRNA 51A	32
1.6.3. LncRNA 17A	33
1.6.4. LncRNA NDM29	34
1.7. MICRORNAs (MIRNAS)	34
1.8. SEQUESTRO DE MICRORNAs POR LNCRNAs	35
1.9. ESTRUTURAS DE RNAs	37
1.9.1. Estruturas secundárias de RNAs	37
1.9.2. Estruturas terciárias de RNA	40
1.10. PREDIÇÃO DE ESTRUTURAS DE RNA	41
1.10.1. Predição de estruturas secundárias de RNA	42
1.10.2. Predição de estruturas terciárias de RNA	42
1.11. PREDIÇÃO DE INTERAÇÃO ENTRE MRNAS, LNCRNAs E MIRNAS	44
2. OBJETIVOS	44
3. MATERIAIS E MÉTODOS.	44
3.1. SEQUÊNCIAS PRIMÁRIAS DOS LNCRNAs	44

3.2.	PREDIÇÃO DE ESTRUTURAS SECUNDÁRIAS	45
3.3.	PREDIÇÃO DE ESTRUTURAS TERCIÁRIAS	45
3.4.	PREVISÃO DE ALVOS DE MIRNAS	46
3.5.	ANÁLISE DAS ESTRUTURAS	47
4.	RESULTADOS	48
4.1.	ESTRUTURA SECUNDÁRIA BACE1-AS	48
4.2.	ESTRUTURA SECUNDÁRIA 51A	52
4.3.	ESTRUTURA SECUNDÁRIA 17A	55
4.4.	ESTRUTURA SECUNDÁRIA NDM29.	57
4.5.	ESTRUTURA TERCIÁRIA BACE1-AS.	60
4.6.	ESTRUTURA TERCIÁRIA 51A.	63
4.7.	ESTRUTURA TERCIÁRIA 17A.	64
4.8.	ESTRUTURA TERCIÁRIA NDM29.	66
4.9.	INTERAÇÃO DE MIRNAS COM BACE1-AS.	68
4.10.	INTERAÇÃO DE MIRNAS COM 51A.	71
4.11.	INTERAÇÕES DE MIRNAS COM 17A.	74
4.12.	INTERAÇÕES DE MIRNAS COM NDM29.	75
4.13.	INTERAÇÕES DA ESTRUTURA 3D DE BACE1-AS COM MIRNAS.	76
4.14.	INTERAÇÕES DA ESTRUTURA 3D DE 51A COM MIRNAS.	81
4.15.	INTERAÇÕES DA ESTRUTURA 3D DE 17A COM MIRNAS.	83
5.	DISCUSSÃO	85
6.	CONCLUSÃO.	103
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	104

1. INTRODUÇÃO

1.1. A DOENÇA DE ALZHEIMER

A demência é um declínio progressivo na capacidade cognitiva, que se torna grave o suficiente para interferir nas atividades diárias, causada por disfunções no cérebro de uma pessoa. A doença de Alzheimer (DA) é o tipo mais comum de demência e representa cerca de 60% a 80% dos casos de demência, afetando em sua grande maioria, pessoas com 65 anos ou mais. A DA é uma doença neurodegenerativa com comprometimento progressivo das funções comportamentais e cognitivas, prejudicando a memória, linguagem, atenção, raciocínio e julgamento. O início antes dos 65 anos é incomum e é observado apenas em 5% dos pacientes com DA. Até o momento, não existe uma cura para DA, embora existam tratamentos que possam amenizar alguns sintomas (Kumar et al., 2020).

Os sintomas da DA dependem do estágio da doença. A doença pode ser classificada em estágio pré-sintomático, leve e demencial, dependendo do grau de comprometimento cognitivo. A perda de memória de curto prazo é o sintoma inicial mais comum e é desencadeado em grande parte dos pacientes. Esse sintoma é seguido pelo comprometimento no julgamento, a falta de motivação e desorganização, levando a problemas com diferentes tarefas, necessitando de auxílio de cuidadores para realizar simples tarefas diárias (Tang et al., 2019).

Nos estágios iniciais, o comprometimento do funcionamento do cérebro varia de sutil a significativo, seguido por distúrbios na fala e comprometimento das habilidades espaciais. Sintomas neuropsiquiátricos como apatia, retraimento social, agitação, psicose e perambulação também são comuns nos estágios seguintes. A dificuldade em executar tarefas motoras tende a ocorrer ao final da doença, assim como, disfunção olfativa, distúrbios do sono, distonia, acatisia e sintomas parkinsonianos. Sendo seguido por reflexos primitivos e dependência total de cuidadores (Maccioni et al., 2018).

A DA pode ser categorizada em início tardio (LOAD) e esporádica (SAD) ou de início precoce (EOAD) e familiar (FAD). A FAD está associada principalmente a mutações na proteína precursora amilóide (APP) e genes presenilina (PSEN1 e PSEN2), enquanto o SAD possui uma origem complexa, envolvendo fatores genéticos, ambientais, metabólicos ou virais (Lambert e Amouyel, 2011). A maior parte dos casos de DA ocorre após os 65 anos, constituindo a LOAD, enquanto os casos que ocorrem antes dos 65 anos são mais raros,

constituindo menos de 5% de todos os casos, sendo denominados EOAD (Alzheimer Association, 2020).

A APP é uma proteína transmembrana formada por um grande domínio externo, uma porção intramembranosa e uma porção intracelular pequena. Essa proteína pertence a uma família evolutiva conservada, representada em mamíferos pela própria APP e proteínas semelhantes a APP (APLPs) 1 e 2. A APP é responsável pela formação do peptídeo β -amiloide ($A\beta$), componente central das placas amiloides, ou senis, que acredita ser a principal característica patológica da DA (Weingarten et al., 2017).

Os genes PSEN1 e PSEN2 codificam as subunidades catalíticas da enzima γ -secretase, responsável pela clivagem sequencial de APP, após a clivagem pela enzima α -secretase ou pela β -secretase. Mutações presentes nos *loci* prejudicam a atividade enzimática e a conformação das subunidades da proteína, levando a um acúmulo anormal de $A\beta$ e agregação na forma de placas amiloides (Escamilla-Ayala et al., 2020).

Diversos fatores de risco podem ser associados à DA, sendo o aumento da idade, o fator de risco mais significativo. Além do aumento da idade, a depressão, doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, tabagismo, histórico familiar de demência, níveis aumentados de homocisteína e presença do alelo APOE4 também aumentam o risco da DA. Possuir um parente de primeiro grau com DA aumenta o risco de desenvolver a doença em até 30%. Ter dois ou mais irmãos com LOAD, aumenta em três vezes o risco de desenvolver a doença em comparação à população em geral (Liljegen et al., 2018).

Além da proteína APP e das alterações nos genes PSEN, existe outro produto gênico que aumenta consideravelmente o desenvolvimento da DA, sendo essa a proteína APOE. A apolipoproteína E (APOE) é uma proteína que possui três isoformas, APOE2, APOE3 e APOE4, sendo APOE4 o maior fator de risco genético para a SAD e o marcador mais relevante para a LOAD (Giri et al., 2016).

A expressão do alelo APOE4 aumenta a quantidade de oligômeros e a deposição de placas neurotóxicas, sendo que essa expressão é revertida na expressão do alelo APOE2 (Hudry et al., 2013). No entanto, há evidências de que as isoformas APOE2 e APOE4 estão envolvidas no processo de agregação e deposição de peptídeos $A\beta$, associadas à neurodegeneração, embora o efeito do APOE4 pareça ser mais significativo que APOE2 (Pankiewicz et al., 2014). A expressão de APOE4 também promove a liberação da proteína tau fosforilada e predispõe os neurônios à lesão (Serrano-Pozo et al., 2021).

1.2. TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

A DA é uma doença de natureza multifatorial, sua progressão pode ser ocasionada por diversos fatores e a diversidade desses fatores acaba limitando a busca por opções farmacológicas devido às múltiplas vias patogênicas. Mesmo depois de décadas de estudo da DA e de esforços da indústria farmacêutica, não existe terapia eficaz disponível para curar ou inibir significativamente a progressão da doença.

Apesar da dificuldade em encontrar medicamentos contra DA com eficácia comprovada, a Food & Drug Administration (FDA), agência regulatória de drogas farmacológicas dos EUA, aprovou em junho de 2021, o uso do medicamento Aducanumab para o tratamento de DA (U.S. Food and Drug Administration, 2021). Essa é a primeira droga aprovada para DA desde 2003. Enquanto os medicamentos disponíveis focam em tratar os sintomas da demência, como a perda de memória, esse é o primeiro que propõe retardar o avanço da doença.

O Aducanumab é um anticorpo monoclonal que tem como alvo a proteína β -amiloide (BACE1), proteína que possui grande papel no desenvolvimento da DA. Esse anticorpo possui uma alta afinidade com espécies oligoméricas neurotóxicas de peptídeos $A\beta$ e visa remover depósitos de $A\beta$ nos estágios iniciais de DA, para evitar a progressão da doença (Cummings et al., 2021).

Além do Aducanumab, existem mais quatro medicamentos que auxiliam na redução dos sintomas causados pela DA, apesar da utilidade dessas drogas serem limitadas, esses medicamentos são: Donepezila, Galantamina, Rivastigmina e Memantina. Três dessas drogas atuam em vias colinérgicas do sistema nervoso central (SNC), incluindo donepezil, galantamina e rivastigmina. As três drogas têm atividade anticolinesterase, e a galantamina também está presente como um modulador alostérico em receptores de acetilcolina nicotínica (Graham et al., 2017). Cada um desses fármacos é aprovado para demência leve a grave, embora sejam frequentemente usados para pacientes em estágio pré-demência. A memantina era a droga mais recente, antes do Aducanumab, aprovada para DA nos Estados Unidos e é a primeira droga aprovada a ter como alvo o receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) e as vias glutamatérgicas (Knight et al., 2018).

As terapias farmacológicas para DA continuam sendo uma grande necessidade não atendida. As pesquisas atuais seguem focadas no desenvolvimento de abordagens terapêuticas

para retardar ou interromper a progressão da doença, considerando os novos aspectos, dos marcadores de diagnóstico e do diagnóstico preciso do estado da doença de cada indivíduo (Dubois et al., 2016).

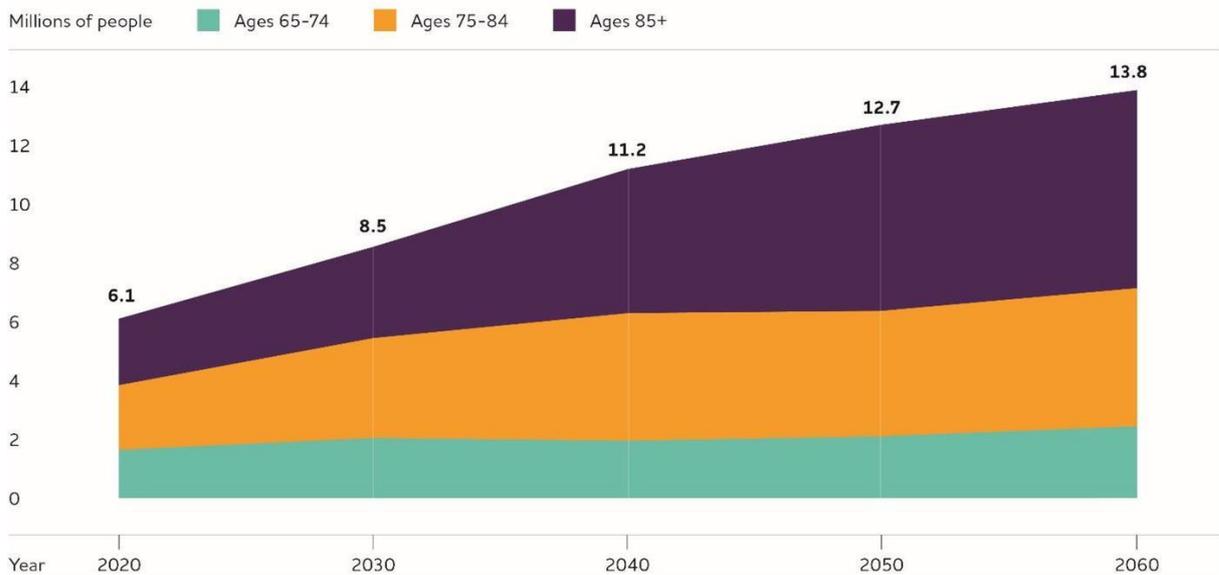
Os diagnósticos neuropatológicos de DA podem ser feitos com confiabilidade razoável, utilizando biomarcadores de imagem de tomografia por emissão de pósitrons (LCR) ou líquido cefalorraquidiano (PET), como marcadores substitutos para o acúmulo de A β (Lowe et al., 2019). Nakamura e colaboradores (2018) demonstraram também que pode ser possível detectar a deposição de A β no SNC por meio do uso da avaliação plasmática de espécies de A β .

1.3. PREVALÊNCIA DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Em 2018, a organização *Alzheimer's Disease International* estimou para a demência, uma prevalência de 50 milhões de pessoas em todo o mundo, com grandes chances de triplicar até 2050, com pelo menos, dois terços dessas pessoas vivendo em países de baixa e média renda. Os dados mais recentes estimam que a prevalência na Europa irá dobrar até 2050 (Scheltens et al., 2021).

Com base em cálculos atualizados pela *Alzheimer Association*, estima-se que 6,2 milhões de estadunidenses com 65 anos ou mais vivam com a DA. Cerca de 4,5 milhões desses estadunidenses possuem 75 anos ou mais. À medida que o número de idosos cresce exponencialmente, também aumenta o número de novos casos de DA. Conforme mostrado na Figura 1, o número de pessoas com 65 anos ou mais com DA pode crescer para 12,7 milhões até 2050, dificultando a progressão dos avanços médicos para prevenir, retardar ou curar a doença. Pessoas com 65 anos ou mais sobrevivem em média de quatro a oito anos após o diagnóstico de DA, porém algumas podem sobreviver até 20 anos. Isso reflete a progressão lenta e incerta da doença (Alzheimer Association, 2021).

Figura 1 - **Gráfico de prevalência de DA nos EUA.** Número projetado de pessoas com 65 anos ou mais na população dos EUA com demência de Alzheimer, de 2020 a 2060.



Fonte: Alzheimer Association, 2021.

No Brasil, onde há mais de 29 milhões de pessoas acima dos 60 anos, cerca de 2 milhões de pessoas possuem diferentes tipos de demência, sendo que cerca de 40 a 60% delas são do tipo Alzheimer, segundo os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Porém, esses dados ainda são subestimados e difíceis de serem exatos, devido a muitos diagnósticos incorretos da doença (Sociedade Brasileira de Geriatria e Gerontologia, 2019).

1.4. PRINCIPAIS PATOGÊNESES DA DOENÇA DE ALZHEIMER

O campo de pesquisa para compreender a patogênese da DA e projetar terapias eficientes é vasto. A DA é progressiva e altamente complexa. As patogêneses características de DA mostram agregados extracelulares de placas $A\beta$ e emaranhados neurofibrilares intraneuronais (NFTs), compostos de microtúbulos hiperfosforilados associados a proteína tau. Os peptídeos $A\beta$ e NFTs são considerados os principais responsáveis pela progressão da DA.

1.4.1. Hipótese da cascata amiloide

A patogênese amiloide ocorre devido a clivagem alterada da proteína precursora amiloide (APP), sequencialmente pelas proteínas β -secretases (BACE1) e γ -secretases, gerando peptídeos $A\beta$ insolúveis. Os peptídeos $A\beta$ se unem e formam oligômeros, difundindo-se em fendas sinápticas e interferindo na sinalização (Crews e Masliah, 2010).

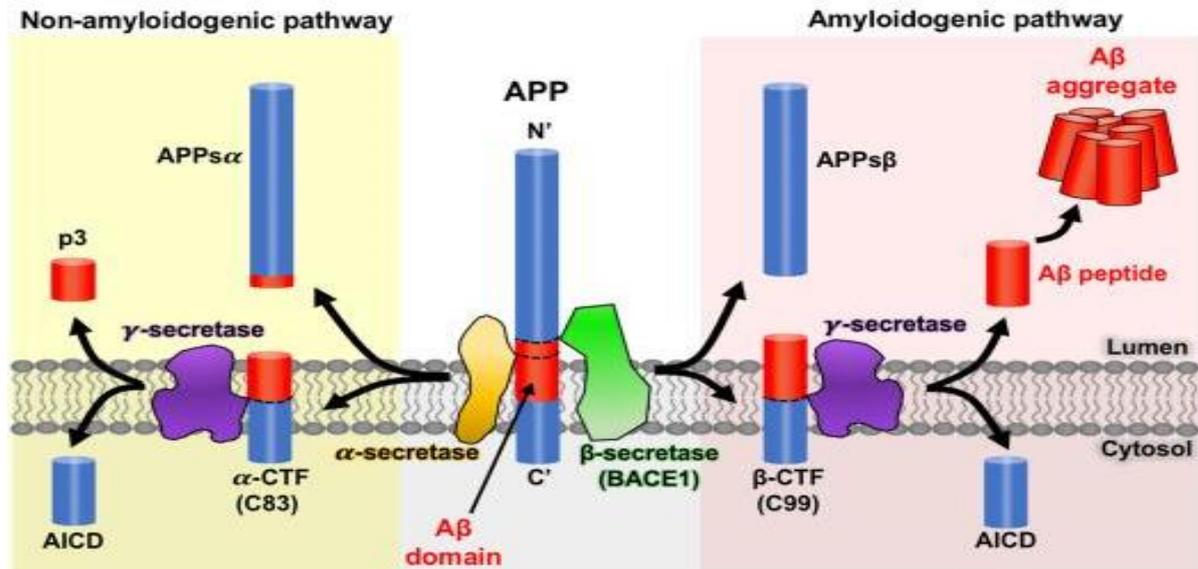
Além da via patogênica da APP, existe uma via natural onde a clivagem gera fragmentos que vão proporcionar uma sinalização sináptica saudável. A via natural acontece quando há o processamento sequencial pelas enzimas α -secretases e γ -secretases, resultando em um

peptídeo chamado APP α solúvel (sAPP α) e um peptídeo menor chamado P3. A proteólise por enzimas com atividade de α -secretase impede a atividade sequencial de β - γ secretase. O processamento α -secretase libera sAPP α , que age como fator neuroprotetor. A presença de sAPP α está relacionada à sinalização sináptica normal e à plasticidade sináptica. Além disso, o processamento sequencial libera o domínio intracelular P53, que facilita a sinalização nuclear, as vias de expressão e regulação genética (Tiwari et al., 2019).

Alternativamente, no estado alterado considerado patogênico, a clivagem é feita por β -secretase liberando sAPP β e retendo o fragmento C99 na membrana, que posteriormente, é clivado por γ -secretase e libera peptídeos A β insolúveis. A clivagem de C99 pela γ -secretase libera um domínio intracelular de APP no citoplasma, que se transloca para o núcleo. Esse estado alternativo da clivagem de APP, degradada sequencialmente pela enzima β -secretase (BACE1) e γ -secretase, promove a síntese de A β . Essa clivagem alternativa sequencial é conhecida como cascata amiloide (Qiu et al., 2009).

Na Figura 2, as duas vias de clivagem de APP podem ser observadas, sendo a via saudável encontrada a esquerda, onde há a clivagem sequencial pelas α -secretases e γ -secretases, gerando fragmentos que vão exercer a proteção neuronal. Também pode ser observada a via amiloidogênica que causa danos neuronais, devido aos fragmentos gerados pela clivagem sequencial de β -secretase e γ -secretases. Os peptídeos A β gerados e agregados excessivamente no cérebro causam neurotoxicidade, formando placas senis, que estão intimamente relacionadas à patogênese da DA, danificando múltiplos sistemas de neurotransmissores.

Figura 2 - **Vias de processamento de APP.** Representação esquemática da clivagem da proteína APP por duas vias distintas, a não-amiloidogênica auxilia na manutenção neuronal e a amiloidogênica produz peptídeos A β , responsáveis por danos neuronais.



Fonte: Tan e Gleeson, 2019.

Quando os peptídeos A β ficam depositados no hipocampo e no segmento basal, na forma de placas amiloides neurotóxicas, recrutam mais A β para formar agregados insolúveis, que induzem dano mitocondrial e disfunção sináptica. As micróglias e astrócitos são ativados e induzem reações inflamatórias. Eventualmente, ocorrem disfunções neuronais e apoptose, o que resulta na DA (Hardy e Selkoe, 2002).

A hipótese da cascata amiloide é reforçada pelo fato de que a DA pode ocorrer devido às mutações autossômicas dominantes no gene APP e mutações em PSEN1 e PSEN2, que, consequentemente, aumentam a produção e agregados de A β . Modelos de camundongos transgênicos que expressam formas mutadas de proteínas PSEN ou APP ligadas à FAD, mostram progressivamente a evolução da perda de memória, devido a formação placas senis no cérebro, o que fortalece a hipótese de que o acúmulo de A β estimula a progressão da DA (Karran et al., 2011).

As mutações no gene PSEN são as principais causas de FAD, com mais de 150 mutações mapeadas para os genes PSEN1 e PSEN2. A maioria dessas mutações levam a geração da forma A β 42 sobre A β 40, mediando a clivagem no resíduo 639 de APP ao invés do resíduo 637. Em SAD, o aumento da expressão da β -secretase devido a mutações no gene, também contribui para o acúmulo de A β no cérebro do paciente (Uddin et al., 2020).

Além da formação normal do peptídeo A β pela clivagem alterada de APP, foi demonstrado que peptídeos A β se espalham pelo cérebro por uma conformação patogênica

semelhante à proteína prião. O A β derivado do cérebro de pacientes com DA e A β sintético injetados no cérebro de camundongos transgênicos mostraram aparências semelhantes a prião, o que induziu a formação de placas e a deposição extensa de A β (Condello e Stöehr, 2018). A proteína prião é uma conformação especial de uma proteína codificada pelo hospedeiro, com capacidade de auto reprodução, infecção e capacidade de permanecer oculta, sobrevivendo até em ambientes desnaturantes (Prusiner, 2012).

Nortley e colaboradores (2019) demonstraram que as deposições A β diminuem os vasos sanguíneos do cérebro e reduzem o suprimento de energia no cérebro de pacientes com DA, resultando na diminuição do fluxo sanguíneo, o que causa queda em até 50% do fluxo sanguíneo na matéria cinzenta de pacientes com DA.

Atualmente, os objetivos das estratégias terapêuticas baseadas na hipótese amiloide são reduzir a formação e agregação de A β e diminuir a quantidade de A β . A ação direta é reduzir a produção de A β controlando a atividade de BACE1 e γ -secretase. No entanto, os inibidores da γ -secretase não possuem especificidade de substrato para a APP e são tóxicos para muitos órgãos (Geling et al., 2002).

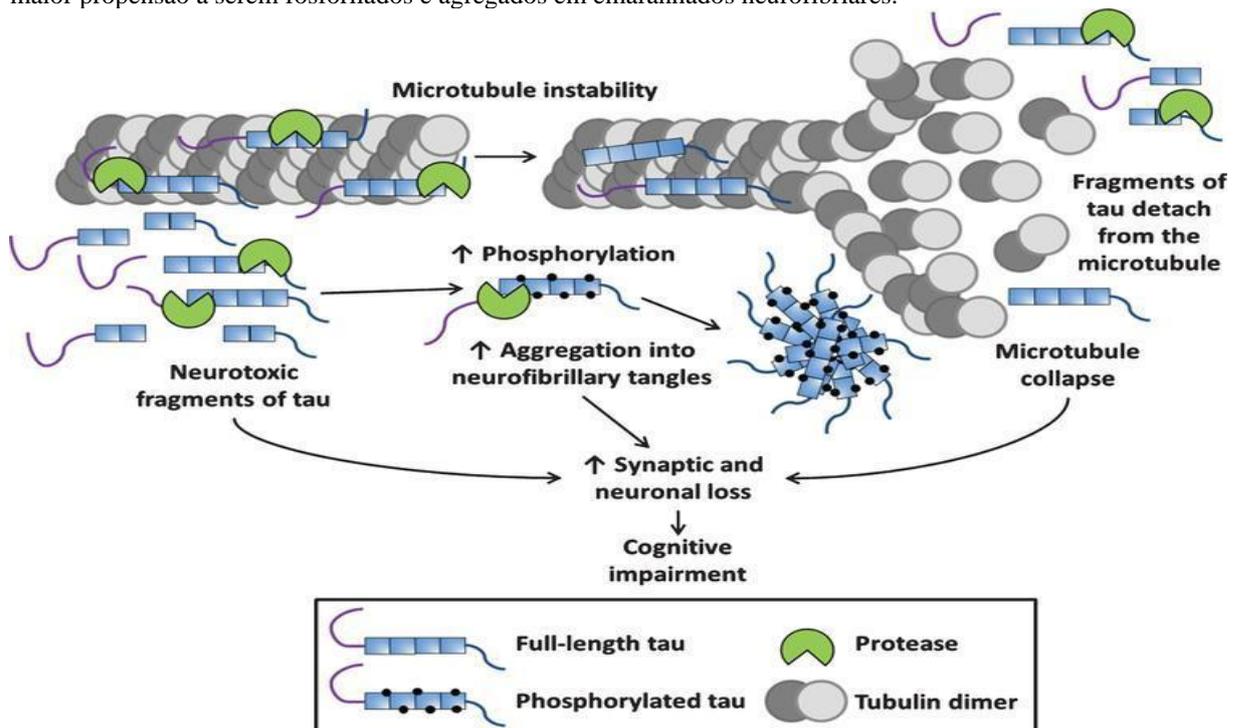
1.4.2. Hiperfosforilação da proteína tau

A tau é uma proteína envolvida na montagem e estabilização de microtúbulos. Possui seis isoformas em humanos, resultantes de *splicing* alternativo. A proteína tau é expressa principalmente nos neurônios do sistema nervoso central. Nos neurônios, a tau é encontrada predominantemente nas regiões distais dos microtúbulos axonais. Acredita-se que a tauopatia na DA seja um resultado da cascata amiloide, e não um evento distinto na patogênese da doença (Selkoe e Hardy, 2016).

A hiperfosforilação da tau, ocorre devido aos níveis elevados de tau, que levam a interações e polimerizações entre as proteínas tau, formando filamentos helicoidais insolúveis que resultam em depósitos fibrilares intraneuronais conhecidos como NFTs (Kimura et al., 2013). As NFTs reduzem o número de sinapses, gerando neurotoxicidade e causam disfunção celular. A hiperfosforilação da tau está positivamente correlacionada com o grau de agregação da tau e a gravidade patológica da DA (Mocanu et al., 2008). Além disso, a acetilação e o truncamento da proteína tau, inibem sua capacidade de se ligar aos microtúbulos, prejudicando a saúde dos neurônios, e promovendo a agregação excessiva de tau e disfunção mitocondrial (Guo et al., 2017).

Na Figura 3, é possível observar a proteólise da proteína tau. As proteínas tau normalmente se ligam aos microtúbulos encontrados nos axônios dos neurônios, promovendo a estabilidade dos microtúbulos e a passagem de impulsos nervosos. A fosforilação excessiva causada nas proteínas tau, fazem com que essas moléculas percam sua interação com os microtúbulos e sofram ação de proteases que formam fragmentos neurotóxicos. Devido a fosforilação, as proteínas tau se acumulam e interagem entre si, formando os emaranhados neurofibrilares. A perda da interação entre tau e microtúbulos causam disfunção sináptica, devido ao colapso dos microtúbulos. Os emaranhados neurofibrilares ficam depositados em meio intracelular, dificultando a passagem de impulsos nervosos e causando neurotoxicidade intraneuronal. Conseqüentemente, os neurônios podem ser alvos de células protetoras do sistema nervoso, causando a morte dos neurônios afetados.

Figura 3 - **Esquema da proteólise da tau e sua contribuição para a patogênese da tauopatia.** O papel fisiológico da proteína tau é ligar-se aos microtúbulos e auxiliar na sua função. Durante a tauopatia, as proteases clivam a tau em fragmentos que se mostraram neurotóxicos. Os fragmentos proteolíticos de tau podem ter uma maior propensão a serem fosforilados e agregados em emaranhados neurofibrilares.



Fonte: Quinn e colaboradores, 2018.

O estágio da patologia da tau se correlaciona com a progressão do comprometimento cognitivo na DA. Com a idade, a forma patológica de tau se acumula no córtex e nos lobos temporais, mesmo na ausência de declínio cognitivo (Crary et al., 2014).

A fosforilação excessiva resulta em menor afinidade de ligação aos microtúbulos. A tau hiperfosforilada também é redirecionada do compartimento axonal para o compartimento

somatodendrítico, onde prejudica a função sináptica inibindo tráfico de receptores de glutamato (Mandelkow et al., 2007).

A proteína tau também é transmitida no cérebro de maneira semelhante a um prião, assim como no caso dos peptídeos A β comentado anteriormente. Jack e colaboradores (2013) demonstraram que a baixa atividade de tau do tipo prião está associada a períodos de vida mais longos; 100 amostras de tecido cerebral *postmortem* de pacientes que faleceram devido a SAD, mostraram a presença de ambas as proteínas tau e A β do tipo prião.

Nos últimos anos, a proteína tau tem ganhado atenção, devido dificuldade de desenvolver tratamentos direcionados ao peptídeo A β e, também, porque a patologia da tau possui uma melhor correlação com os comprometimentos cognitivos (Congdon e Sigurdsson, 2018). Grande parte dos inibidores de agregação de tau mostrou toxicidade e falta de eficácia, como o inibidor da agregação de tau, LMTM (TRx0237) (Gauthier et al., 2016). A molécula epotilona D melhorou a patologia relacionada à tau, porém devido a seus efeitos tóxicos, seus testes clínicos foram encerrados (Barten et al., 2012).

1.4.3. Neuroinflamação

A inflamação crônica dos neurônios é observada no cérebro de pacientes com DA. Agregados patológicos como placas amiloides e NFTs são os principais desencadeadores da resposta inflamatória na DA. A inflamação no cérebro de pacientes com DA é mediada principalmente por micróglia e astrócitos. De relevância para a DA, foi demonstrado que a micróglia e astrócitos reativos regulam positivamente enzimas que agravam a patologia da DA, por exemplo, BACE-1 e γ -secretase (Zhang e Jiang, 2015).

A neuroinflamação fornece um papel neuroprotetor durante uma resposta aguda, mas se acaba se tornando prejudicial quando se transforma em uma resposta crônica. Durante a resposta crônica, as micróglia ativam diferentes respostas pró-inflamatórias e tóxicas, incluindo espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico e citocinas. Foi demonstrado por Plassman e colaboradores (2000) que níveis elevados de interleucina 1 (IL-1) foram responsáveis pelo aumento da produção de APP e A β . Além disto, a neuroinflamação resulta em níveis elevados de IL-1, aumentando a produção de citocinas, que estimulam a ativação de CDK5, quinase responsável pela hiperfosforilação de tau (Quintanilla et al., 2004). O papel da neuroinflamação na DA pode ser crucial na produção de A β e na hiperfosforilação da tau, estabelecendo um elo entre essas principais patologias distintas na DA. (Kinney et al., 2018).

1.5. EPIGENÉTICA NA DOENÇA DE ALZHEIMER

A epigenética se refere a fenótipos e processos transmitidos para outras células e ocasionalmente, a futuras gerações, mas não são causados por diferenciações na sequência de bases do DNA. Os efeitos epigenéticos são causados por mudanças na expressão gênica resultantes de alterações na estrutura da cromatina ou outros aspectos da estrutura do DNA, como a metilação do DNA. O traço epigenético pode ser definido como “um fenótipo herdado com estabilidade resultante de mudanças na cromatina sem alterações na sequência de DNA” (Pierce, 2011). A definição de epigenética foi ampliada para incluir qualquer alteração da estrutura da cromatina ou no DNA que afete a expressão gênica.

A DA se manifesta principalmente em pessoas com 65 anos ou mais, sendo o envelhecimento, o principal fator de risco para seu desenvolvimento, sendo associado a processos de senescência celular. A senescência é um mecanismo de controle de células danificadas, porém, o acúmulo de células senescentes durante o envelhecimento compete com células normais, bloqueando a capacidade de regeneração de tecidos e liberando fatores que estimulam a inflamação crônica e contribuem para a degeneração neuronal (Kritsilis et al., 2018). Alterações epigenéticas são detectadas durante a senescência, levando a mudanças na desativação e ativação genética na senescência celular, que, quando presentes em células do sistema nervoso durante o envelhecimento, podem levar a neurodegeneração (Nacarelli et al., 2017).

A epigenética envolve respostas resultantes de fatores ambientais e essa é a diferença entre a epigenética e as alterações genéticas, que geralmente são independentes dos estímulos ambientais (Mirbahai e Chipman, 2014). Existem três principais mecanismos epigenéticos que regulam a interação entre genes e fatores ambientais, que incluem a metilação do DNA, a modificação de histonas e regulação por moléculas de RNA não codificantes.

A metilação do DNA é o fenômeno epigenético mais estudado, controla a expressão genética e envolve a adição de um grupo metil ao DNA. O processo não altera a sequência do DNA, embora modifique a atividade do DNA, a expressão gênica e o funcionamento dos genes. A metilação do DNA é o mecanismo de epigenética mais amplamente investigado por seu envolvimento com vários distúrbios como DA, Parkinson e depressão (Sharma et al, 2020)

Piaceri e colaboradores (2015) demonstraram metilações específicas em amostras de cérebro *postmortem* com DA, focada em genes relacionados com a produção do peptídeo A β , envolvido na formação de emaranhados neurofibrilares e *APOE*. No trabalho de Humphries e

colaboradores (2015) não foi demonstrada nenhuma evidência de um padrão epigenético alterado nas regiões desses genes em cérebros com DA, e resultados semelhantes foram obtidos do sangue de pacientes vivos com DA.

Algumas correlações entre as características patológicas da DA e alterações de metilação específicas do gene foram estudadas por exemplo, nos níveis de metilação do promotor do gene NCAPH2/LMF2, que são correlacionados com a atrofia do hipocampo em indivíduos com DA (Kobayashi et al, 2016). Há também a relação dos níveis de folato em pacientes com DA, com alterações de metilação ou específicas do gene (Bednarska-Makaruk et al, 2016).

As proteínas histonas estão intimamente associadas ao DNA e são as proteínas mais abundantes no núcleo de uma célula. As proteínas histonas envolvem o DNA e fornecem estabilidade ao DNA. A histona se agrega para formar um octâmero e o DNA é envolvido em torno desse octâmero para formar o nucleossomo. As proteínas histonas são propensas a várias modificações pós-traducionais em seu N-terminal, incluindo acetilação, fosforilação e metilação de ADP (Anderson e Turko, 2015).

Evidências revelaram modificações de histonas em modelos de camundongos transgênicos de DA. A acetilação aumentada na histona H4 ocorre nas fases iniciais da cascata amiloide, quando os peptídeos A β começam a se depositar no cérebro. Além disso, a acetilação da histona H4 também foi observada durante o comprometimento cognitivo leve, sendo um possível biomarcador de DA em seu estágio inicial (Bannister e Kouzarides, 2011). As modificações na histona H3 nos resíduos lisina 3 e 27, também demonstraram ser cruciais na patogênese da DA (Watson et al, 2016).

Junto com a modificação de histona e metilação do DNA, RNAs não codificadores (ncRNA) também são potenciais reguladores epigenéticos da patogênese da DA. Os ncRNAs podem ser pequenos, possuindo menos de 200 nucleotídeos (nt), ou longos, que possuem mais de 200 nt. MicroRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs não codificadores de 19 a 25 nt, que podem corresponder imperfeitamente à sequência de um RNA mensageiro (mRNA), resultando na inibição de sua tradução ou na degradação do próprio mRNA. Genes localizados em regiões de cromatina ativa são comumente regulados por miRNAs (Makarova et al., 2016).

Os miRNAs pertencentes à família miR-29 são os mais bem categorizados na regulação de BACE1 (β -secretase), gene que codifica a enzima responsável pela geração do peptídeo A β ,

e foram encontrados desregulados no cérebro e nos tecidos do sangue periférico de pacientes com DA (Lei et al, 2015).

Em contraste aos miRNAs, RNAs longos não codificadores (lncRNA) regulam a estrutura da cromatina interagindo com proteínas, RNA e DNA. Os lncRNAs podem atuar como reguladores, inibidores competitivos de interações moleculares e ativadores de transcrição genética (Hu et al., 2018).

Os lncRNAs também possuem um papel na patologia da DA. Utilizando análises de *microarray*, foram encontrados nos tecidos do hipocampo de um modelo de rato com DA, um total de 315 lncRNAs e 311 mRNAs que estavam significativamente desregulados (Yang et al, 2017). Esses resultados demonstram que podem existir mais lncRNAs relacionados a DA a serem encontrados, além dos estudados neste trabalho.

1.5.1. RNAs longos não codificadores (lncRNAs)

A análise genômica do transcriptoma eucariótico revelou que até 90% do genoma humano é transcrito. Porém, os genes codificadores de proteínas representam apenas 2,94% do genoma, enquanto o restante são ncRNAs (Quinn e Chang, 2016).

Os transcritos não codificadores são classificados em ncRNAs de manutenção e ncRNAs regulatórios. Os ncRNAs de manutenção incluem ribossomos, RNAs nucleares pequenos (snRNAs) e RNA nucleolares pequenos (snoRNAs). Os ncRNAs reguladores são geralmente divididos em duas classes, de acordo com o comprimento dos nucleotídeos. Os RNAs com menos 200 nucleotídeos são normalmente referidos como ncRNAs curtos, incluindo microRNAs (miRNAs), RNA de interferência pequeno (siRNA) e RNAs de interação com Piwi (piRNA), e os RNAs com mais de 200 nucleotídeos são conhecidos como lncRNAs (Nagano e Fraser, 2011).

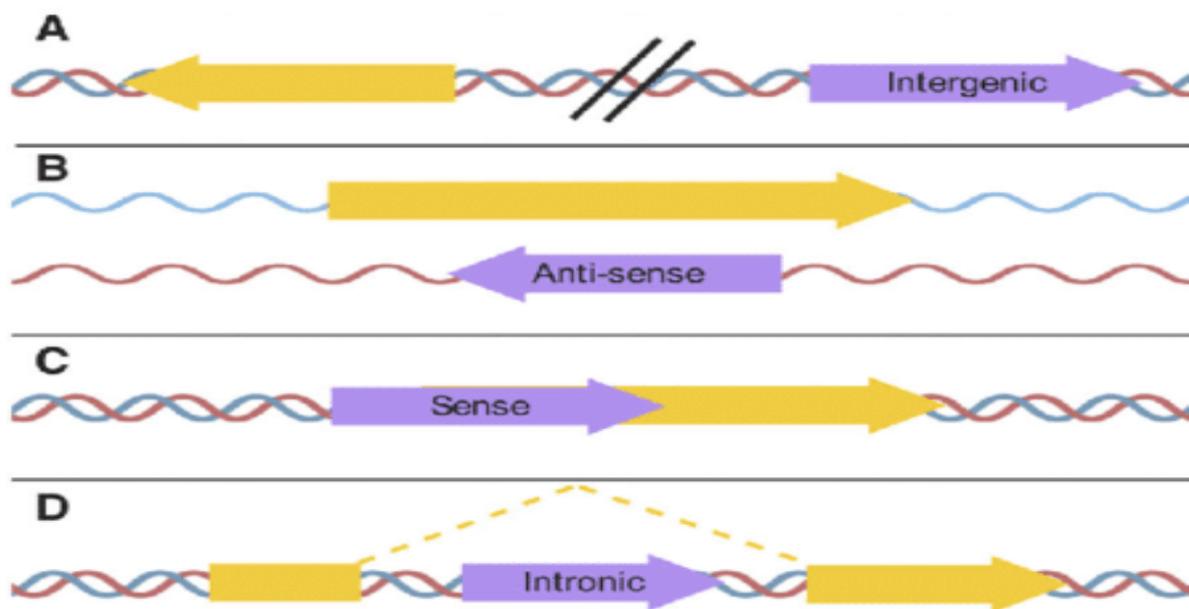
Os transcritos de lncRNAs são parcialmente semelhantes aos RNAs mensageiros (mRNAs), pois são frequentemente transcritos pela RNA polimerase II, contêm pareamentos clássicos (GU/AG), possuem uma estrutura semelhante a mRNA, contendo íntrons e parte de éxons, exibem *splicing* alternativo, porém, não possuem um quadro de leitura aberto na sequência pois não codificam proteínas, e estão associados aos mesmos tipos de modificações de histonas que os genes codificadores de proteínas (Ponting et al., 2009).

Os lncRNAs podem ser categorizados em diferentes grupos, de acordo com a localização do genoma, sequência, estrutura e características de função. Os lncRNAs podem

ser divididos em lncRNAs intergênicos, que estão localizados entre dois genes na mesma fita, observados na FIGURA 4A; e lncRNAs intrônicos, que são derivados de um íntron da mesma fita de DNA, observados na FIGURA 4D. A localização por vezes determina o contexto da função do lncRNA (Betancur, 2016).

Outro tipo de classificação tem relação à orientação do produto da fita de DNA, dividindo os lncRNAs em *sense*, que é transcrito a partir da fita de genes codificadores, encontrado na FIGURA 4C; e *antisense*, que é transcrito a partir da fita complementar de genes codificadores, mostrado na FIGURA 4B. Outros padrões de classificação dependem se ele está associado a um elemento de DNA conhecido, podendo ser dividido em lncRNAs associados a acentuadores, lncRNAs associados a promotores, RNA *antisense upstream* e RNA de repetição telomérica (St. Laurent et al., 2015).

Figura 4 - **Categorias de RNAs longos não codificadores.** Tipos de lncRNAs com base em sua posição genômica, orientação e localização próxima a genes codificadores de proteínas. (A) intergênico, (B) antisense, (C) sense e (D) intrônico.



Fonte: Tsagakis e colaboradores, 2020.

Cada categoria de lncRNA tem sua própria localização específica. Os lncRNAs que são próximos a genes codificadores ou agrupamentos com genes codificadores são bastante estudados e fornecem evidências funcionais para a compreensão do mecanismo de regulação transcricional e epigenética dos lncRNAs (Wu et al., 2014).

Como reguladores *cis*, lncRNAs exercem sua função em genes vizinhos, no mesmo alelo a partir do qual são transcritos, exibindo correlação de expressão. Por outro lado, a atuação em *trans* pode controlar a expressão de um gene à distância de seu local de transcrição,

alterando o estado da cromatina, influenciando a estrutura ou regulando a função de proteínas (Kopp e Mendell, 2018)

Os lncRNAs possuem uma estrutura secundária específica que fornece diversos locais para interação de proteínas ou entre DNA e RNA pelo princípio da complementaridade de bases. O lncRNA foi, originalmente, considerado o "lixo" da transcrição genômica e sem funções biológicas. No entanto, foi demonstrado que os lncRNAs participam ativamente no genoma, regulando a expressão gênica nos níveis epigenéticos, transcricional e pós-transcricional, além de participar do silenciamento do cromossomo X e muitos outros processos importantes (Goff e Rinn, 2015).

A versatilidade funcional dos lncRNAs ocorre pela sua capacidade de formar diferentes estruturas e interagir com proteínas, RNA e DNA. Em complexos de ribonucleoproteínas (RNPs), lncRNAs podem estabilizar os complexos, direcionando-os para *loci* específicos. Além de proteínas, também existe a interação de lncRNAs com DNA. Isso leva à formação de triplex RNA-DNA, uma estrutura presente *in vivo* e que facilita o reconhecimento do gene alvo dos lncRNAs (Guttman e Rinn, 2012).

As funções regulatórias de lncRNAs também consistem de interações RNA-RNA. A interação com miRNAs cria uma rede que exerce a regulação pós-transcricional. LncRNAs podem encobrir sítios de interação de miRNAs e agir como “esponjas” moleculares que sequestram miRNAs que agem sobre outros transcritos. A competição entre lncRNAs e miRNAs para a interação com mRNAs alvo leva à desrepressão da expressão gênica (Ballantyne et al., 2016).

1.6. LNCRNAs RELACIONADOS COM A DOENÇA DE ALZHEIMER

Fatores genéticos e epigenéticos, conjuntamente com a interação com mecanismos ambientais, estão envolvidos na patogênese de doenças neurodegenerativas, incluindo a DA (Millan, 2017). Os lncRNAs têm relação comprovada com a produção de A β , comprometimento sináptico, inflamação, disfunção mitocondrial e respostas ao estresse, mecanismos centrais envolvidos na patogênese de DA.

A expressão anormal de alguns lncRNAs e seus níveis aumentados no plasma, foram propostos como potenciais biomarcadores para a DA (Zhang, 2016). Alguns lncRNAs favorecem as patogêneses da DA, devido a seus efeitos bioquímicos e funcionais. Por exemplo:

remodelação da cromatina, regulação pós-transcricional, pós-traducional e organização de complexos de proteínas (Luo e Chen 2016).

Os lncRNAs estão envolvidos na regulação da expressão gênica e nas patogêneses associadas à DA. Compreender as redes regulatórias e os mecanismos moleculares dos lncRNAs na DA, possibilitará o desenvolvimento de novos tratamentos farmacológicos com lncRNAs como alvos mais apropriados (Cortini et al., 2019).

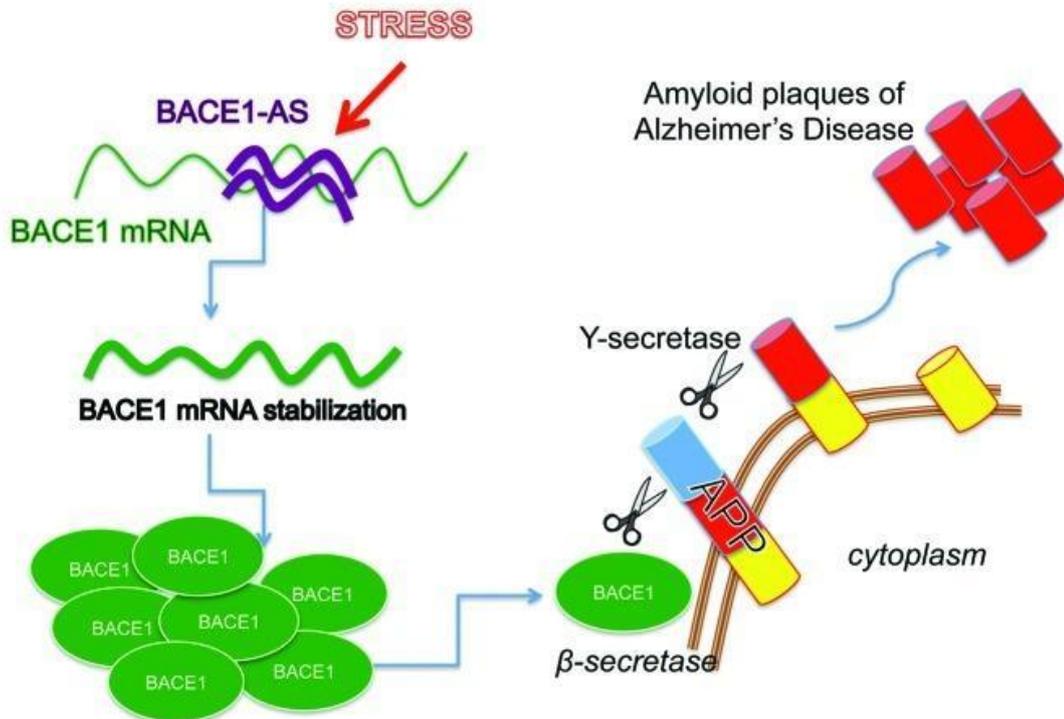
É importante ressaltar que os lncRNAs podem ser utilizados como biomarcadores da DA para a detecção da patogênese, diagnóstico e a possível prevenção, principalmente se for detectado por meio da sua expressão anormal no sangue (Feng et al., 2018). Seguindo essa ideia, o uso de lncRNAs tem sido explorado na oncologia, como biomarcadores, onde foi associado ao prognóstico de pacientes com câncer, incluindo carcinoma hepatocelular, câncer colorretal e mama (Xie et al., 2013).

1.6.1. LncRNA BACE1-AS

O acúmulo extracelular do peptídeo A β é uma das patologias mais significativas em pacientes com DA. A produção de A β necessita da clivagem proteolítica sequencial de APP por β -secretase e γ -secretase. A enzima de clivagem de APP no local beta 1 (BACE1) é uma protease que aumenta a quantidade de produtos da β -secretase, os peptídeos A β . A BACE1 é altamente expressa no cérebro de pacientes com DA. Sua expressão e a atividade enzimática são consideravelmente aumentadas conforme a progressão da doença (Faghihi et al., 2008).

O transcrito *antisense* de BACE1 (BACE1-AS) é um RNA transcrito da fita complementar do *locus* BACE1 do cromossomo 11, que regula a expressão do gene BACE1 nos níveis de mRNA e proteico. No organismo humano, ambos transcritos de BACE1 e BACE1-AS têm uma sobreposição de cerca de 100 nucleotídeos no exon 6 (Modarresi et al., 2011). Ao regular a expressão de BACE1, o lncRNA BACE1-AS desempenha um papel importante no controle da DA. A Figura 5 mostra como o lncRNA BACE1-AS estabiliza a expressão do mRNA e, conseqüentemente, aumenta a produção da proteína BACE1, gerando peptídeos A β , que formam as placas senis, responsáveis pela patogênese da cascata amiloide. O estímulo das isoformas A β 40 e A β 42 também aumenta a expressão do BACE1-AS, aumentando a estabilidade do mRNA de BACE1 e gerando A β adicional (Chen et al., 2019).

Figura 5 - **BACE1-AS aumenta a produção de BACE1 e peptídeos A β** . A geração das placas amilóides deriva da clivagem sequencial da proteína precursora amilóide (APP) por β -secretase (BACE1) e γ -secretase. BACE1 está aumentado em pacientes afetados devido à estabilização do mRNA causada pela interação ao seu RNA não codificadores BACE1-AS.



Fonte: Pastori e Wahlestedt, 2012.

Com o pareamento entre BACE1-AS e BACE1, as isoformas A β -42 e A β -40 são geradas progressivamente pela proteína BACE1, afetando as vias de clivagem de APP. Dessa forma, o A β gerado excessivamente pode afetar a regulação do BACE1-AS, aumentando a formação de placas senis no cérebro de pacientes com DA e agravando o desenvolvimento da doença (Faghihi et al. 2008). Provocar um silenciamento em BACE1 ou BACE1-AS altera o nível de acúmulo de A β . A alteração dos níveis de proteína BACE1 regula a produção e acúmulo de A β , essa alteração evita que haja uma proteólise excessiva na APP por meio da BACE1 (Modarresi et al., 2011).

O estresse celular aumenta os níveis da concentração de BACE1-AS, resultando na expressão positiva de BACE1, o que contribui para o processamento de APP e a produção de A β . Níveis elevados de A β promovem a superexpressão de BACE1-AS e o processamento de APP. Ao formar um RNA dúplex, BACE1-AS proporciona um aumento na estabilidade do mRNA do BACE1. Dessa forma, BACE1 e BACE1-AS, conjuntamente, podem atuar como potenciais biomarcadores e alvos de tratamento para a DA (Liu et al., 2014).

Os níveis de expressão de BACE1-AS no sangue de pacientes foram avaliados, tanto nos exossomos plasmáticos quanto no plasma. Os níveis de BACE1-AS foram

significativamente mais altos no plasma dos pacientes considerados com DA total, em comparação com os pacientes de controle, e houve uma diminuição significativa nos níveis de BACE1-AS em pacientes que foram considerados pré-DA. Não houveram diferenças significativas nos níveis de BACE1-AS nos exossomos plasmáticos entre os grupos pré-DA, DA completa e controle. (Fotuhi et al., 2019)

Uma pesquisa conduzida na China por Wang e colaboradores (2020) teve o objetivo de determinar se a medida do plasma combinada com dados de imagem do córtex entorrinal e hipocampo poderia utilizar lncRNAs como biomarcadores de DA. Um total de 134 participantes chineses (72 pacientes com DA e 62 controles) foram reunidos do Segundo Hospital da Universidade de Shandong, Shandong, China entre maio de 2017 e julho de 2019. Os dois grupos, com DA e controle, foram categorizados com base no sexo, idade e nível de escolaridade. Os resultados desse estudo demonstraram que a detecção dos níveis plasmáticos de BACE1-AS combinados com o volume e a espessura do córtex entorrinal direito podem ser usados como biomarcadores de DA.

1.6.2. LncRNA 51A

O gene do receptor neuronal relacionado à sortilina (SORL1, também conhecido como SORLA e LR11) é considerado um gene relacionado à patogênese da cascata amiloide, de forma indireta. O produto do gene SORL1 é uma proteína transmissora, que é expressa na membrana plasmática de neurônios do sistema nervoso central e periférico (Lee et al., 2008).

A proteína SORL1 atua como receptor de seleção da proteína APP, interagindo com o APP em endossomos, onde afeta o processamento proteolítico. A SORL1 age como um agente inibidor de acúmulo de APP na membrana plasmática, dessa forma, evitando a proteólise excessiva de APP por meio das ações de α -secretase e BACE1. A SORL1 direciona a APP internalizada para a rede trans-Golgi, impedindo que a proteína passe por processamento amiloidogênico (Yin et al., 2015).

Assim como BACE1, o gene SORL1 possui um lncRNA que pode interagir e regular a expressão de seus produtos. O lncRNA 51A foi identificado pela primeira vez *in silico* e confirmado por ensaio de atividade do promotor à base de luciferase. O 51A é um lncRNA que mapeia em configuração *antisense* no íntron 1 do gene SORL1, cuja síntese promove a expressão de variantes de SORL1 processadas alternativamente. O lncRNA 51A altera o padrão de processamento de SORL1, promovendo a expressão da variante alternativa ao invés da

variante canônica da proteína. Devido a isso, o processamento de APP é prejudicado, resultando em um aumento da deposição de A β (Ciarlo et al., 2013).

A superexpressão de 51A foi confirmada em modelos *in vitro* e em cérebros de pacientes com DA. O mecanismo de 51A intensifica a formação de A β por meio da regulação negativa da variante canônica de SORL1, evitando sua tradução para a proteína e que forme os endossomos com APP internalizada. Devido a perda de SORL1, a APP fica disponível em excesso na membrana dos neurônios e sofre proteólise de BACE1 (Ma et al., 2009).

Um estudo conduzido por Feng e colaboradores (2018), mostrou que 51A está positivamente regulada no plasma de pacientes com SAD, sugerindo seu possível papel como biomarcador para DA. Os mesmos autores demonstraram que a expressão desse lncRNA se correlaciona negativamente com a progressão da doença avaliada pela classificação do mini exame de estado mental (MEEM).

1.6.3. LncRNA 17A

O 17A é um lncRNA produzido pela RNA polimerase III, expresso no cérebro humano e superexpresso em tecidos cerebrais de pacientes com DA (Massone et al. 2011). O lncRNA 17A é transcrito a partir do íntron 3 do gene do receptor 51 acoplado à proteína G humana (GPR51) ou do receptor GABAB2. O 17A induz a síntese de uma isoforma de GABAB2 por meio de processamento alternativo, gerando uma variante com sinalização intracelular reduzida. Desse modo, afeta a transcrição da forma canônica do GABAB2, prejudicando significativamente a via de sinalização do GABAB (Gavazzo et al., 2013).

Os receptores GABAB (GBRs) são os principais reguladores da transmissão sináptica no cérebro. Os GBRs pré-sinápticos inibem a liberação de uma variedade de neurotransmissores, enquanto os GBRs pós-sinápticos geram correntes inibitórias que hiperpolarizam a membrana e inibem a atividade neuronal. A regulação negativa de GBRs pré-sinápticos está presente em respostas à atividade neuronal e em doenças, incluindo DA, epilepsia e doença de Parkinson (Dinamarca et al., 2019)

A variante afeta a função biológica de GABA B, regulando o acúmulo intracelular de monofosfato de adenosina 3'-5'-cíclica (cAMP) e a ativação de canais de potássio específicos. Esses eventos prejudicam a sinalização de GABA B, aumentam a secreção de A β e a proporção de peptídeos A β . Consequentemente, a superexpressão de 17A desencadeia uma resposta inflamatória no cérebro. O lncRNA 17A é regulado positivamente em comparação com os

tecidos de controle, sugerindo que ele pode estar envolvido com a DA e a cascata amiloide, devido a produção de A β causada por sua expressão (Wan et al., 2017).

No trabalho de Massone e colaboradores (2011), a superexpressão do lncRNA 17A aumentou a secreção e proporção de A β em uma linha celular de neuroblastoma. Wang e colaboradores (2019) também mostraram que a superexpressão de 17A em um modelo de célula com DA promove a autofagia, induz a neurodegeneração e desativa a sinalização de GABAB.

1.6.4. LncRNA NDM29

O marcador de diferenciação de neuroblastoma 29 (NDM29) é transcrito pela RNA polimerase III a partir do primeiro íntron do gene ASCL3 e sua síntese é regulada por um promotor extragênico tipo 3, composto por um TATA box, um elemento de sequência proximal e um elemento de sequência distal (Pagano et al., 2007). Os promotores do tipo 3 são únicos entre os elementos Pol III, pois utilizam apenas elementos reguladores *upstream*, que se assemelham a promotores canônicos de Pol II (Schramm e Hernandez, 2002).

Em seres humanos, o NDM29 mapeia a região genômica do cromossomo 11, cuja deleção está implicada no desenvolvimento de neuroblastoma (De Preter et al., 2005). Células com superexpressão do NDM29 exibem propriedades oncosupressoras, que leva à diminuição da proliferação, diferenciação e aumento da quimiossensibilidade (Castelnuovo et al., 2010).

A influência da expressão de NDM29 no processamento de APP e a cascata amiloide foi analisada por Massone e colaboradores (2012). Notou-se que a expressão de NDM29 é aumentada por citocinas inflamatórias, como a IL-1 α , que possui expressão elevada no cérebro de pacientes com DA (Massone et al. 2012). O NDM29 também direciona a APP para a via amiloidogênica e aumenta a atividade da β -secretase e γ -secretase, causando o aumento da secreção de A β (Luo e Chen, 2016).

O NDM29 aumenta significativamente o nível de produção de APP, e consequentemente, a produção das duas principais isoformas de A β , A β 42 e A β 40, levando ao acúmulo e formação da placa senil. Estímulos inflamatórios também ocasionam a expressão do NDM29 e formação de A β (Gu e Guo, 2013).

1.7. MICRORNAS (MIRNAS)

Os microRNAs (miRNAs) são uma classe de RNAs não codificadores que são reconhecidos como reguladores essenciais para a expressão gênica pós-transcricional por

reprimir a tradução ou degradar mRNAs. Desde sua descoberta, os miRNAs foram identificados como os reguladores envolvidos em diversos eventos biológicos importantes, como desenvolvimento, crescimento, diferenciação e processos neurodegenerativos (O'Brien et al., 2018).

A síntese de miRNAs se inicia no núcleo, sob a ação da RNA polimerase II, que origina o miRNA precursor primário, sendo subsequentemente processado para produzir outro miRNA precursor (pré-miRNA). O pré-miRNA é então transferido para o citoplasma, onde é convertido em um miRNA maduro. Atualmente, existem cerca de 2.650 miRNAs encontrados em humanos (Zhao et al., 2016)

Um único miRNA pode afetar vários genes e um gene pode ser regulado por vários miRNAs, demonstrando que são uma ferramenta potencial para investigação de doenças multifatoriais, como por exemplo, a DA. Devido à sua gama de alvos, miRNAs são capazes de regular diversos processos celulares.

Os miRNAs têm participação confirmada na patologia da DA por vários mecanismos, incluindo a regulação da atividade do BACE1. Os miRNAs miR-200a-3p, miR-195, miR-338-5p, miR-34a-5p, miR-125b-5p, miR-132, miR-384, miR-339-5p, miR-135b, miR-425-5p e miR-339-5p estão entre os miRNAs cuja interação com BACE1 foi confirmada (Samadian et al., 2021).

Hébert e colaboradores (2008) demonstraram perfis de expressão de microRNAs em pacientes com SAD e descobriram que os níveis de expressão do miR29a/b1 diminuíram significativamente com altos níveis de expressão de BACE1. Uma análise posterior mostrou que miR-29a/b-1 pode regular a expressão de BACE1. Além disso, a diminuição dos níveis de miR-29a/b-1 pode contribuir para a patogênese da DA.

1.8. SEQUESTRO DE MICRORNAS POR LNCRNAS

RNAs endógenos competidores (ceRNAs) são transcritos que compartilham elementos de resposta mútuo com miRNAs e regulam a expressão uns dos outros competindo pelos mesmos sítios de interação dos miRNAs. A hipótese de ceRNAs propõe que alguns transcritos específicos podem se comunicar utilizando um sinal específico. Os elementos de resposta mútua são sítios de interação de miRNAs dentro de transcritos de RNA específicos (Salmena et al., 2011).

Como mencionado anteriormente, o acúmulo de peptídeos A β é um dos pontos principais da patogênese de DA. A proteína BACE1 tem sua síntese elevada em cérebros de pacientes com DA. Portanto, a regulação alterada de BACE1 tem um papel importante na patologia. Tanto miRNAs quanto lncRNAs foram implicados na regulação de BACE1, um dos mais relevantes sendo o lncRNA BACE1-AS. Zeng e colaboradores (2019) revelaram que BACE1-AS compartilha elementos de resposta de miRNAs com BACE1 e que BACE1-AS pode atuar como um ceRNA que sequestra miRNAs que têm como alvo BACE1, evitando que o mRNA de BACE1 seja degradado. Para validar a hipótese, utilizaram a ferramenta de bioinformática Miranda (John et al., 2004) para encontrar possíveis miRNAs que tem como alvo BACE1 e BACE1-AS. Como resultado, encontraram cinco miRNAs (mir-29, mir-107, mir-124, mir-485 e mir-761) que afetam ambos RNAs. Os sequestros dos miRNAs citados resultam em um aumento da expressão de BACE1 (Zeng et al., 2019).

O BACE1-AS também agrava a neurotoxicidade em DA por outro mecanismo relacionado com ceRNAs. O BACE1-AS sequestra o miRNA miR-214-3p e altera a autofagia. A autofagia é um processo fisiológico natural para a entrega de componentes celulares e organelas desnecessárias aos lisossomos para degradação. Níveis reduzidos de miR-214-3p foram encontrados no plasma de pacientes com DA, devido a ação de BACE1-AS. O miR-214-3p, por meio do bloqueio da transcrição do gene ATG12, atua como um inibidor de autofagia e apoptose, fornecendo um efeito neuroprotetor (He et al., 2020).

Zhou e colaboradores (2021) demonstraram que BACE1-AS pode modular indiretamente a expressão de ATG5 em células, sequestrando o miRNA miR-214-3p. ATG5, codificado pelo gene 5 relacionado à autofagia (ATG5), é um gene chave da autofagia que é alvo de miR-214-3p. Devido ao sequestro desse miRNA, BACE1-AS causa danos neuronais devido ao silenciamento de miR-214-3p e expressão excessiva de ATG5 na DA.

Os lncRNAs 51A, 17A e NDM29 não possuem ação de ceRNA confirmada até o momento. As buscas baseadas nas funções de BACE1-AS, forneceram diversos resultados relevantes, mostrando que esse lncRNA possui mecanismos além de seu padrão, que seria manter a estabilidade de BACE1 formando um duplex. Os mesmos métodos utilizados para BACE1-AS, podem também ser utilizados para os outros lncRNAs citados na pesquisa. Os resultados obtidos por meio dessas buscas podem fornecer informações relevantes sobre esses lncRNAs, podendo auxiliar no combate a DA.

Porém, antes de se realizar as buscas das interações que os lncRNAs possuem com os miRNAs, precisa-se conhecer o máximo possível sobre a molécula que será utilizada na pesquisa. Os lncRNAs formam estruturas que auxiliam na compreensão de sua função, por esse motivo, as estruturas formadas por essas moléculas precisam ser conhecidas antes de se realizar uma análise mais detalhada sobre a interação com miRNAs.

1.9. ESTRUTURAS DE RNAS

O RNA é o mecanismo central para inúmeras funções biológicas na codificação, decodificação, regulação e expressão gênica. Os RNAs formam estruturas estáveis e específicas que desempenham suas funções biológicas (Caprara e Nilsen, 2000). O pareamento de bases de RNA está relacionado às habilidades de codificação e replicação do RNA, permitindo que o RNA sirva como um fator de especificidade na orientação da atividade de processos como a metilação de DNA e o silenciamento mediado por miRNAs (Schroeder et al., 2004).

Os *riboswitches* e ribozimas geralmente são exemplos da importância das estruturas secundárias de RNA, se organizando para desempenhar suas funções biológicas. Diferentemente, grande parte dos RNAs não codificantes, como miRNAs e lncRNAs, formam complexos para executar suas funções. A compreensão das moléculas de RNA e de suas funções requer conhecimento sobre suas estruturas. Sendo assim, o conhecimento da estrutura revela grande parte das ações que um RNA possui no organismo (Cech e Steitz, 2014).

1.9.1. Estruturas secundárias de RNAs

As estruturas secundárias de RNA (2D) são formadas por pareamentos de bases de Watson-Crick (WC), presentes na estrutura do RNA. Os pareamentos WC são utilizados para descrever estruturas de RNAs. Grande parte do trabalho de predição de estruturas de RNA se concentra no nível da estrutura 2D, pois esse tipo de estrutura tem informações importantes sobre a função de uma sequência de RNA (Mathews et al., 2010). A estrutura 2D é um bom exemplo da importância do pareamento de bases WC, que podem ser utilizados para formação de elementos estruturais que permitem a interação do RNA com outras moléculas.

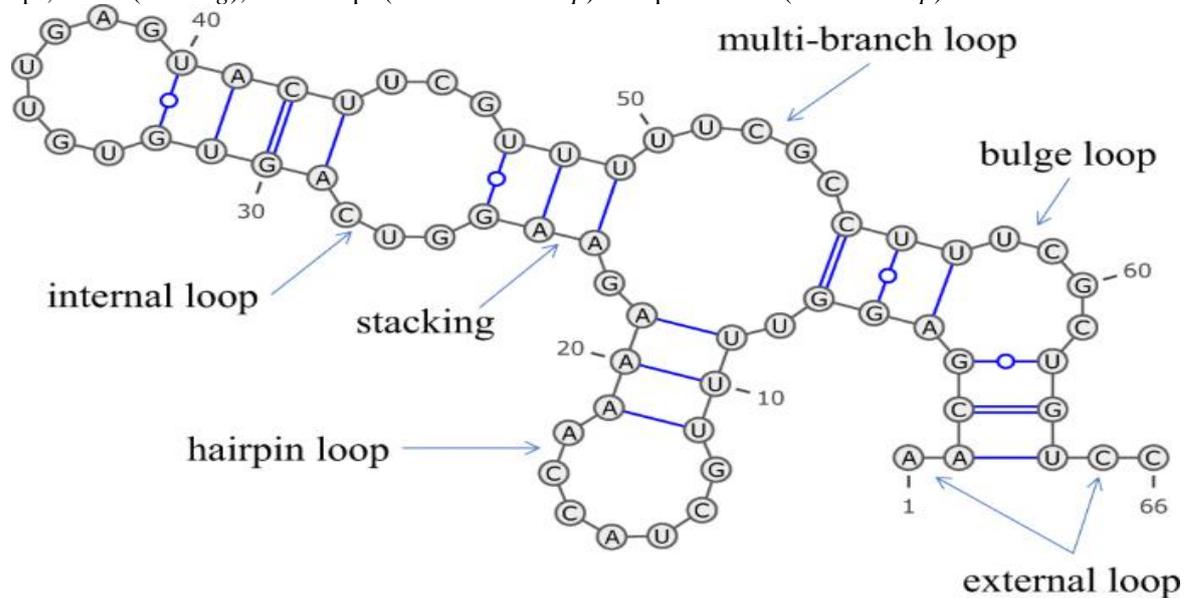
A estrutura do RNA é geralmente definida pelos nucleotídeos "A", "C", "G" e "U". Por meio da formação das ligações de hidrogênio, os dois grupos de bases complementares A-U e C-G, formam pares de bases estáveis, conhecidos como pares de bases WC. Enquanto os pares A-U formam duas ligações de hidrogênio, os pares C-G formam três ligações de hidrogênio e tendem a ser mais estáveis do que os pares A-U. Outras bases podem também formar pares,

especialmente o par G-U. Os pares G-U são conhecidos como *wobble*, formando duas ligações de hidrogênio e também são importantes para manter a estabilidade da estrutura secundária do RNA (Lodish et al., 2007).

Existem sete elementos estruturais secundários reconhecidos no RNA: os grampos, os *bulge loops*, os *loops* internos, os *multi-loops*, as regiões de fita única, as hélices e os *pseudoknots*. A haste é um elemento importante que compõe outros elementos estruturais, como o grampo, hélices e *pseudoknots*. As hastes são formadas pelos pareamentos de bases WC, formando fitas de dupla hélice que antecedem uma alça formada por um elemento estrutural. Quando uma haste é parte de uma hélice, ela pode ser referida como uma haste helicoidal (Westhof et al., 2011).

Na Figura 6, é possível observar as representações dos elementos estruturais secundários. A partir do começo na sequência de RNA, pode-se encontrar na imagem o *loop* externo (*external loop*), sendo formados pelas fitas sem pareamento ao começo e final da sequência. Seguido pelo *bulge loop*, um elemento estrutural secundário que possui uma alça formada por apenas uma fita sem pareamento e a fita oposta com pareamentos normais. Logo após o *bulge loop*, existe o *multi-branch loop*, que é alça com três hastes ou mais ligadas a ela. Uma das hastes do *multi-branch loop* possui a formação de um grampo (*hairpin loop*), onde existe a haste e uma alça ao final dessa haste. Continuando na estrutura secundária, o local categorizado como *stacking* pode ser considerada uma haste formada por pareamentos WC. O último elemento encontrado na estrutura é o *loop* interno (*internal loop*), formado por duas fitas de RNA sem pareamento.

Figura 6 - **Representação da estrutura secundária.** Uma estrutura secundária de RNA pode ser formada por vários tipos de elementos secundários, incluindo grampos (*hairpin loop*), loops internos (*internal loop*), bulge loops, hastes (*stacking*), multi-loops (*multi-branch loop*) e loops externos (*external loop*).



Fonte: Sato e colaboradores, 2021.

As estruturas de lncRNAs são um dos fatores mais importantes para que a molécula possa desempenhar sua função. A estrutura secundária e terciária do lncRNA são de grande relevância para o estudo dos mecanismos moleculares do RNA em processos biológicos, como a interação com outras biomoléculas e características da classificação de RNAs (Delli Ponti et al., 2017).

A estrutura secundária lncRNAs é dobrada conforme sua energia mínima livre e a formação da estrutura é afetada pela condição celular e ambiente interno em que se encontra. Após a formação completa da estrutura secundária, o RNA forma uma complexa estrutura categorizada como terciária, por uma alta complementação do emparelhamento WC (Cruz e Westhof, 2009).

A estrutura de lncRNA possui plasticidade, essa característica permite sua participação em diversas funções, como catálise e regulação. As transcrições de RNA de fitas longas, como dos lncRNAs, são mais flexíveis, formando estruturas mais complexas, eficazes para interação molecular e regulação. Essa flexibilidade confere ao lncRNA a possibilidade de atuar como reguladores de reações moleculares e formando *motifs* estruturais para regulação específica por meio do RNA (Dann et al., 2007).

As características dos lncRNAs, como diversidade, conservação e plasticidade, determinam seus papéis funcionais complexos. A variabilidade e flexibilidade das estruturas

secundárias e terciárias dos lncRNAs na dinâmica genômica os levam a ser componentes importantes na regulação epigenética (Smith e Mattick, 2017).

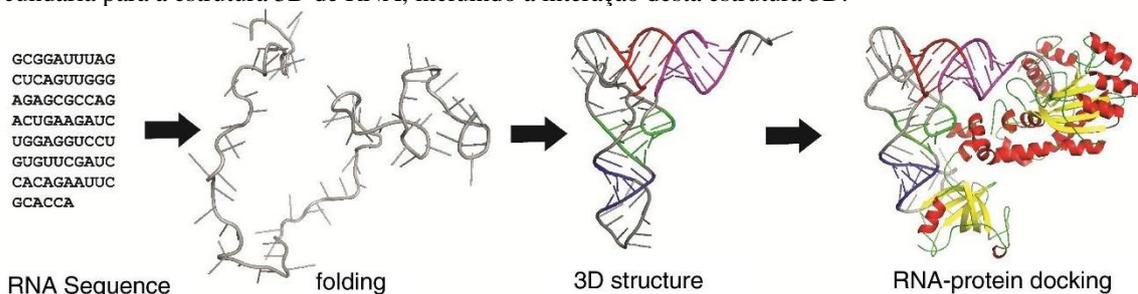
Para compreender a relação entre a estrutura e a função do lncRNA, é necessário reconhecer a estrutura do RNA com exatidão. Os métodos de obtenção da estrutura do RNA são principalmente por meio de algoritmos bioinformáticos, métodos bioquímicos e métodos de estrutura de RNA baseados em sondas enzimáticas (Bevilacqua et al., 2016).

1.9.2. Estruturas terciárias de RNA

A gama de funções presentes dos RNAs ocorre devido a sua capacidade de formar estruturas 3D que atuam como reguladores de resposta a sinais celulares. As estruturas 3D são as posições tridimensionais dos átomos no espaço e concedem interações intramoleculares além do pareamento de bases WC. Como a estrutura 2D, em sua grande maioria, descreve apenas os pares de bases WC na estrutura do RNA, o conhecimento da estrutura 3D é importante para revelar os detalhes relevantes para a interpretação das funções dos RNAs (Laing e Schlick, 2010).

Na Figura 7, é possível observar o exemplo da formação da estrutura 3D de RNA a partir de sua sequência primária, essa sequência se dobra ao se parear com as próprias bases, formando os elementos secundários citados anteriormente. A sequência completamente dobrada com os pareamentos de bases mais estáveis forma a estrutura 3D desse RNA. Com a estrutura 3D, o RNA consegue interagir com outras moléculas, formando estruturas mais complexas e possibilitando o RNA de exercer sua função.

Figura 7 - Um resumo do dobramento de RNA e estrutura de RNA 3D. Um exemplo do fluxo da estrutura secundária para a estrutura 3D de RNA, incluindo a interação desta estrutura 3D.



Fonte: Dawson e colaboradores, 2016.

A formação hierárquica da estrutura do RNA é semelhante à estrutura de proteína, da sequência primária (1D) à estrutura secundária (2D) e à estrutura terciária (3D). No entanto, as interações dos pares de bases de RNA tornam os elementos estruturais do RNA diferentes dos elementos estruturais nas proteínas. A interação *cis* WC/WC é o elemento básico na formação

das regiões helicoidais do RNA, enquanto as outras 11 interações não canônicas contribuem para os elementos estruturais da estrutura 3D. Assim, a estrutura 3D do RNA é composta de regiões helicoidais e elementos estruturais específicos da estrutura 3D (Miao e Westhof, 2017).

As características estruturais dos RNAs possuem grande importância para suas funções biológicas, pois a sequência sozinha não fornece funções suficientes. Assim, um dos objetivos da biologia estrutural é fornecer informações sobre como a estrutura e a dinâmica, de forma livre ou em interação com outras moléculas, levam a funções específicas do RNA no ambiente celular completo (Laing e Schlick, 2010).

1.10. PREDIÇÃO DE ESTRUTURAS DE RNA

A determinação da estrutura de RNA tem ganhado significativa atenção por ser uma das questões fundamentais para a compreensão de doenças genéticas e a criação de novos fármacos. O conhecimento das estruturas dos RNAs também auxilia na compreensão do papel da molécula na célula (Lodish et al., 2007).

Os métodos biofísicos e bioquímicos são um dos mais utilizados para determinar a estrutura do RNA. Os experimentos biofísicos, como cristalografia de raios-X e microscopia crioeletrônica determinam a base estrutural do RNA em resoluções no nível de nanômetro ou angstrom. Os experimentos bioquímicos têm sido utilizados para validar estruturas de RNA (Li et al., 2020). Porém, a determinação de estruturas de RNA por meio de métodos experimentais, como a cristalografia de raios-X e espectroscopia por ressonância magnética nuclear tende a ser demorada e cara. Em consequência desses fatores, a predição de estruturas de RNA por métodos computacionais tem sido utilizada ativamente (Yao et al., 2017).

A formação da estrutura do RNA é considerada como sendo hierárquica, isto é, a formação da estrutura secundária ocorre antes dos contatos terciários. Como grande parte da estabilização dentro de uma estrutura de RNA é devido ao emparelhamento de pares de bases vizinhas, a predição de estrutura secundária se provou uma ferramenta valiosa na modelagem da estrutura de RNA (Westhof et al., 2011).

Algoritmos de programação dinâmica foram desenvolvidos e permitem calcular diversas propriedades de equilíbrio termodinâmico de estruturas secundárias de RNA. Isso envolve predições de energia livre mínima (MFE), probabilidades de emparelhamento de base e amostragem de estruturas aleatórias de acordo com sua probabilidade. O princípio utilizado nesses algoritmos é o modelo do vizinho mais próximo de Turner; as estruturas são

decompostas em *loops* individuais, cada um associado à contribuição de energia livre, derivada de experimentos de fusão e modelagem matemática (Turner e Mathews, 2010).

1.10.1. Predição de estruturas secundárias de RNA

A estrutura secundária do RNA fornece informações importantes para determinar a função de uma sequência primária e fornece uma estrutura para compreender o funcionamento do RNA. Além da determinação de funções, a estrutura secundária é utilizada para determinar a estrutura terciária do RNA desejado (Mathews, 2019).

A predição da estrutura secundária do RNA é bastante utilizada, sendo comum realizar predições utilizando algoritmos de programação dinâmica para encontrar a estrutura de menor valor de energia livre mínima, onde os pares de bases vizinhos mais próximos são utilizados para estimar a estabilidade da dobra do RNA. Os algoritmos de programação dinâmica também foram desenvolvidos para caracterizar o conjunto termodinâmico de estruturas, incluindo a estimativa da probabilidade de pares de bases e estruturas de amostragem (Seetin, 2012).

A predição de estruturas secundárias de RNA determina, por meio de uma sequência primária, o conjunto de pares de bases complementares WC, que definem hastes helicoidais, regiões como grampos e *loops* internos, bem como os de fita simples. Diversos programas computacionais foram projetados para predição de estruturas secundárias de RNA. As abordagens variam, incluindo minimização de energia livre utilizando parâmetros termodinâmicos, predições baseadas no conhecimento de estruturas de RNA que já foram modeladas, algoritmos comparativos de alinhamento de sequência e combinações de todos os anteriores (Reeder et al., 2006).

A energia livre de Gibbs (ΔG) é utilizada para calcular a energia total de diferentes estruturas de RNA, sendo a estrutura com menor energia mínima, a mais estável e aceita. Essa energia é um potencial termodinâmico que mede a capacidade de um sistema de realizar trabalho não mecânico. É também o potencial químico que é minimizado quando um sistema atinge o equilíbrio de pressão e temperatura constantes. Portanto, é amplamente utilizada para calcular a formação da estrutura secundária do RNA (Doshi et al., 2004).

1.10.2. Predição de estruturas terciárias de RNA

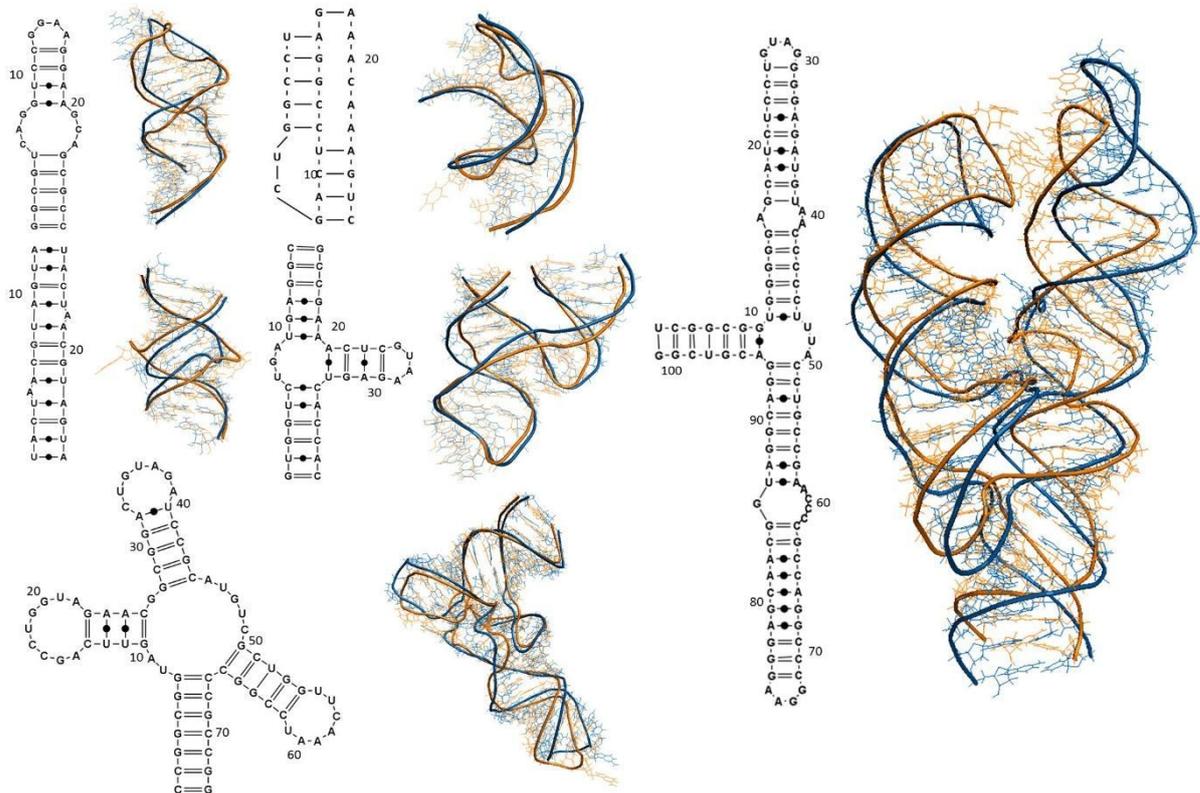
Existem alguns métodos para a previsão da estrutura tridimensional do RNA. As abordagens disponíveis podem ser divididas em três tipos diferentes: modelagem baseada em fragmentos, física e comparativa.

A ideia principal da modelagem baseada em fragmentos é montar elementos 3D de moléculas utilizando pequenos fragmentos de bibliotecas com sequências semelhantes. As etapas desse método consistem, primeiramente, na fragmentação da estrutura secundária. Na segunda etapa, o algoritmo de busca é empregado para combinar os elementos provenientes das bibliotecas de fragmentos, a partir de bancos de dados de estruturas de RNA conhecidas. Na última etapa, os elementos são montados juntos usando diferentes algoritmos e, normalmente, uma etapa de refinamento final em um campo de força atômica (Pucci e Schug, 2019).

A vantagem desse método é sua eficiência, pois a montagem da fragmentação reduz drasticamente o espaço de busca conformacional. Como a diversidade estrutural da biblioteca de fragmentos limita diretamente a precisão da montagem composta, bons resultados requerem uma biblioteca grande e diversa, bem como uma boa função de pontuação.

Na Figura 8 demonstra como o processo de fragmentação da estrutura secundária em diferentes elementos pequenos secundários. Cada elemento presente é buscado na biblioteca de fragmentos de uma ferramenta e os fragmentos são escolhidos baseados na similaridade com os fragmentos da estrutura secundária. Ao final, todos os fragmentos são unidos, montando uma estrutura 3D completa.

Figura 8 - **Elementos secundários montados em estruturas 3D.** Fragmentos de estrutura secundária junto a seus fragmentos similares na estrutura 3D, cada fragmento conjuntamente compõe uma estrutura 3D completa.



Fonte: Zhao e colaboradores, 2012.

1.11. PREDIÇÃO DE INTERAÇÃO ENTRE MRNAS, LNCRNAS E MIRNAS

Análises em larga escala transformaram ncRNAs em um ponto atrativo para a pesquisa. Os ncRNAs, como miRNAs e lncRNAs, são extensivamente pesquisados por seu envolvimento crucial em uma variedade de estados fisiológicos e patológicos importantes (Cech e Steitz, 2014).

A interação entre miRNA e lncRNA expande a complexidade da regulação gênica pós-transcricional. Ambos tipos de RNAs afetam diversas vias biológicas devido às suas regulações, porém, ainda é preciso conhecer mais sobre as possibilidades que a interação pode trazer às diversas vias biológicas. A classificação detalhada das interações constitui o alicerce para compreensão das consequências funcionais dos miRNAs e lncRNAs (Karagkouni et al., 2020).

Com o avanço da tecnologia, ferramentas de bioinformática investigam perfis de expressão em massa de miRNAs sem custos altos. Para avaliar as interações entre lncRNAs e miRNAs, diversas ferramentas de previsão para genes alvo de miRNAs foram desenvolvidas, como por exemplo: TarBase v.8, lncBase v.3, TargetScanHuman, mirSystem e miRDB.

Essas ferramentas são importantes para a descoberta de novas interações entre miRNAs e lncRNAs ou mRNAs e miRNAs, auxiliando em sua compreensão. Alguns miRNAs que já estejam categorizados por outras interações, podem demonstrar algumas funções possíveis dos RNAs alvos, contribuindo enormemente para o conhecimento do funcionamento dos RNAs.

2. OBJETIVOS

O principal objetivo desse projeto é modelar as estruturas secundárias e terciárias dos RNAs longos não codificadores BACE1-AS, 51A, 17A e NDM29, discutidos anteriormente. A obtenção das estruturas proporciona diversas possibilidades de análise, inclusive interações com miRNAs e mRNAs.

A partir das estruturas, o seguinte objetivo é analisar o mecanismo ceRNAs dos lncRNAs, sendo esse o mecanismo também conhecido como sequestro de miRNAs. Além disso, obter os locais de interação dos miRNAs diretamente nas estruturas, o que pode levar a descobertas de sítios alvos em elementos estruturais específicos nos lncRNAs.

3. MATERIAIS E MÉTODOS.

3.1. SEQUÊNCIAS PRIMÁRIAS DOS LNCRNAS

A sequência primária do lncRNA BACE1-AS foi obtida por meio do banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI), a sequência foi depositada por Faghihi e colaboradores (2008), com a identificação NR_037803.2. As sequências primárias dos lncRNAs 17A, 51A e NDM29 foram obtidas do trabalho de Pagano e colaboradores (2007).

A sequência do BACE1-AS possui 823 nucleotídeos de comprimento, o lncRNA 51A possui 272, o lncRNA 17A possui 156 e a sequência do lncRNA NDM29 possui 346. As sequências primárias dos lncRNAs foram utilizadas como dados de entrada para modelagem de estruturas secundárias e terciárias.

3.2. PREDIÇÃO DE ESTRUTURAS SECUNDÁRIAS

O software MFOLD, desenvolvido por Zuker e Stiegler (1981), foi utilizado para predição de estruturas secundárias de RNA utilizando as sequências primárias dos lncRNAs como dados de entrada. A ferramenta faz predição de estruturas secundárias de RNA e DNA utilizando regras termodinâmicas de bases vizinhas mais próximas, visando encontrar o conjunto de pares de bases que produz a menor energia livre mínima por meio dos métodos de programação dinâmica. A ferramenta Mfold também retorna estruturas subótimas com valores maiores do que a estrutura mais estável formada (Zuker et al., 2003). Assim, a ferramenta concede a possibilidade de analisar mais estruturas que podem ser resultantes dos pareamentos de determinado RNA. As estruturas selecionadas para representarem as estruturas secundárias dos RNAs serão as estruturas com menor valor de energia livre mínima, pois tendem a ser mais estáveis (Mathews, 2006). Ao final da predição, as estruturas secundárias selecionadas foram utilizadas como dados de entrada para a ferramenta 3dRNA (Wang et al., 2019).

3.3. PREDIÇÃO DE ESTRUTURAS TERCIÁRIAS

As sequências primárias, obtidas no banco de dados NCBI, e estruturas secundárias modeladas na ferramenta Mfold foram utilizadas como informação de entrada. A ferramenta 3dRNA (Wang et al., 2019) possui um método automatizado para modelar a estrutura 3D de RNAs com base na sequência e na estrutura secundária, construindo a estrutura terciária do RNA a partir dos pequenos elementos secundários (SSEs). Os SSEs incluem hélice, grampo, *loop* interno, *pseudoknot* e *bulge loop*.

O 3dRNA utiliza duas etapas em que, primeiramente, os SSEs são ordenados em alças e fragmentos de fita dupla. Em seguida, essas estruturas são conectadas e formam uma estrutura terciária completa. A primeira estrutura é modelada utilizando a melhor classificação de cada

SSE, as outras estruturas são modeladas a partir de modelos escolhidos aleatoriamente de cada SSE. Dessa forma, a primeira estrutura pode ser uma estrutura semelhante a nativa devido a sua melhor classificação para SSEs (Wang et al., 2019).

As estruturas selecionadas para representarem as estruturas terciárias dos RNAs são as que possuem o menor valor de energia livre mínima geradas pelo sistema de classificação da ferramenta. A ferramenta utiliza um método de classificação próprio, chamado de 3dRNAscore (Wang et al., 2015).

Existem duas funções diferentes na ferramenta 3dRNA, a função “*Assembly*”, que resulta em estruturas terciárias simples sem nenhuma otimização de energia, e a opção “*Optimization*”, que resulta em estruturas otimizadas pela própria ferramenta.

3.4. PREVISÃO DE ALVOS DE MIRNAS

As ferramentas utilizadas para predição de miRNAs que têm como alvo os lncRNAs e mRNAs foram: TarBase v.8 (Karagkouni et al, 2018), lncBase v.3 (Karagkouni, 2020), TargetScanHuman (Lewis et al., 2005), mirSystem (Lu et al, 2012) e miRDB (Chen e Wang, 2020).

As ferramentas lncBase v3.0 (Karagkouni, 2020) e TarBase v.8 (Karagkouni et al, 2018) foram utilizadas para analisar as possíveis interações de miRNAs com o mRNA de BACE1, SORL1, GABAB e ASCL3 e o lncRNA BACE1-AS. As ferramentas utilizam sequências de RNA disponíveis em bancos de dados, como NCBI (1988). As sequências primárias de 51A, 17A e NDM29 não estão disponíveis em banco de dados, apenas no trabalho de Pagano e colaboradores (2007), o que torna inviável a utilização das ferramentas lncBase e TarBase para 51A, 17A e NDM29.

As ferramentas TargetScanHuman (Lewis et al., 2005) e mirSystem (Lu et al, 2012) foram utilizadas para encontrar possíveis interações de miRNAs com os mRNAs de BACE1, SORL1, GABAB e ASCL3.

Com a ferramenta miRDB (Chen e Wang, 2020), é possível encontrar interações de miRNAs tanto com os mRNAs, quanto com os lncRNAs, por possuir uma interface de busca de miRNAs baseada em uma sequência primária fornecida pelo usuário.

Todos os dados gerados pelas ferramentas utilizadas para busca de miRNAs foram reunidos para comparações entre miRNAs que afetam o lncRNA e o mRNA alvo desse

lncRNA. Os miRNAs com interações encontradas com o mRNA e o lncRNA, podem ser miRNAs que possivelmente serão sequestrados pelo lncRNA.

As sequências de mRNA de BACE1, SORL1, GABAB e ASCL3 podem ser encontradas nos bancos de dados do NCBI com as identificações: NM_012104.6 (Zhou et al., 2021), NM_003105.6 (Qiu et al., 2021), NM_005458.8 (Kim et al., 2020) e NM_020646.3 (Luck et al., 2020).

3.5. ANÁLISE DAS ESTRUTURAS

As análises das estruturas secundárias foram realizadas por meio dos dados gerados pela ferramenta Mfold, baseadas na análise visual, na energia livre mínima (kcal/mol), nos pareamentos e elementos estruturais secundários, arquivos brutos com valores *h-num*, *p-num* e *ss-count*.

O valor *h-num* é uma medição numérica que determina o quão bem definida é cada hélice formada na estrutura secundária do RNA. De acordo com Zuker e colaboradores (2003), hélices com valores baixos de *h-num* tendem a ser mais confiáveis, sendo que os valores baixos e altos mudam para cada RNA, não existindo um valor padrão de baixo e alto para o *h-num*. O valor *p-num* representa o número de emparelhamentos que uma base pode formar em todas as dobras a partir da energia mínima. O valor *ss-count* mostra a quantidade de vezes que uma base está sem pareamento.

A análise das estruturas terciárias foi baseada na energia livre mínima gerada pela classificação do 3dRNAscore (Wang et al., 2015). Para analisar visualmente a estrutura em diferentes posições, a ferramenta Pymol (Schrödinger e Delano, 2020) foi utilizada. Na ferramenta é possível anotar todas as dobras e elementos estruturais contidos na estrutura terciária. Ainda com a ferramenta Pymol, foram anotados os sítios de interação dos miRNAs nas estruturas dos lncRNAs.

3.6. INTERAÇÕES ENTRE MIRNAS E ESTRUTURAS DOS LNCRNAs.

A predição de interações dos miRNAs e lncRNAs foi realizada por meio de métodos de comparação entre as sequências primárias de ambos os RNAs. Esse método possibilitou a obtenção de diferentes miRNAs que podem interagir com o lncRNA. Para uma análise mais aprofundada, as interações foram realizadas diretamente na estrutura terciária dos lncRNAs, utilizando também as estruturas terciárias dos miRNAs.

A ferramenta HNADOCK (He et al., 2019) foi utilizada para realizar a interação entre as estruturas terciárias dos lncRNAs e dos miRNAs. O HNADOCK utiliza métodos computacionais para prever as estruturas complexas formadas por interações entre duas moléculas de ácido nucleico por meio de um algoritmo de *docking* hierárquico e uma função de pontuação intrínseca para interações de ácido nucleico. Os dados de entrada para realização das predições foram os arquivos “.pdb” das estruturas terciárias modeladas dos lncRNAs e as sequências primárias dos miRNAs, sendo que, as estruturas terciárias dos miRNAs foram modeladas pelo próprio servidor HNADOCK (He et al., 2019). As predições e as análises foram realizadas apenas nos miRNAs que fazem parte do mecanismo ceRNA dos lncRNAs.

Os melhores modelos de interações resultantes da predição do HNADOCK foram os que possuíam o menor valor de energia livre mínima e o menor valor RMSD (*Root Mean Square Deviation*). O RMSD é a medida da distância média entre os átomos, nesse caso, as distâncias entre os lncRNAs e os miRNAs. Posteriormente, as interações foram observadas e analisadas na ferramenta Pymol (Schrödinger e Delano, 2020).

4. RESULTADOS

4.1. ESTRUTURA SECUNDÁRIA BACE1-AS

A ferramenta Mfold teve como resultado para o lncRNA BACE1-AS, 27 estruturas secundárias para análise cada possíveis pareamentos e estruturas secundárias que a sequência primária poderá possivelmente se dobrar. Como a sequência primária do lncRNA BACE1-AS possui 823 nucleotídeos, sendo a maior sequência comparada aos outros lncRNAs estudados nesse projeto, a quantidade de formatos que essa sequência pode-se dobrar é grande. Na Tabela 1, é possível observar a quantidade de estruturas resultantes da ferramenta e a posição em que estão baseadas na energia livre mínima (kcal/mol) de cada estrutura.

Tabela 1 - **Classificação das estruturas secundárias do BACE1-AS.** Aqui estão presentes as colocações das estruturas secundárias modeladas baseada na energia livre mínima de cada uma. As maiores colocações possuem menor energia livre mínima.

(continua)

Classificação	Energia livre mínima (kcal/mol)	Estrutura
1	-246.21	5
2	-245.75	3
3	-241.50	9
4	-240.91	1
5	-240.11	23
6	-239.24	20

(continuação)

Classificação	Energia livre mínima (kcal/mol)	Estrutura
7	-238.82	10
8	-238.34	8
9	-238.13	18
10	-238.03	14
11	-238.02	6
12	-237.76	15
13	-237.40	7
14	-236.15	11
15	-236.06	27
16	-236.00	24
17	-234.01	13
18	-233.75	26
19	-233.31	25
20	-232.90	2
21	-232.67	4
22	-232.57	22
23	-232.05	19
24	-231.22	17
25	-229.55	12
26	-226.33	16
27	-220.96	21

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

(conclusão)

A estrutura que possui a menor energia livre mínima, tende a ser a estrutura secundária que o RNA formará. Além disso, possuir a menor energia livre mínima deixa a estrutura mais estável quando comparadas a estruturas com valores maiores. A estrutura selecionada foi a estrutura nº5, sendo essa estrutura a primeira na classificação na tabela acima, por possuir os pareamentos com -264.70 kcal/mol.

Devido aos pareamentos realizados baseados nessa energia livre mínima, a estrutura teve o menor valor comparado às outras estruturas geradas com valores pelos pareamentos ótimos e subótimos. A estrutura com pareamentos ótimos ficou em 4º lugar na classificação das estruturas, sua energia livre mínima é maior se comparada com a estrutura nº 5, que é uma das estruturas subótimas. A escolha da estrutura nº 5 mostra a importância de estruturas subótimas, pois, ocasionalmente, a estrutura com os pareamentos ótimos não gera a estrutura com menor energia livre mínima.

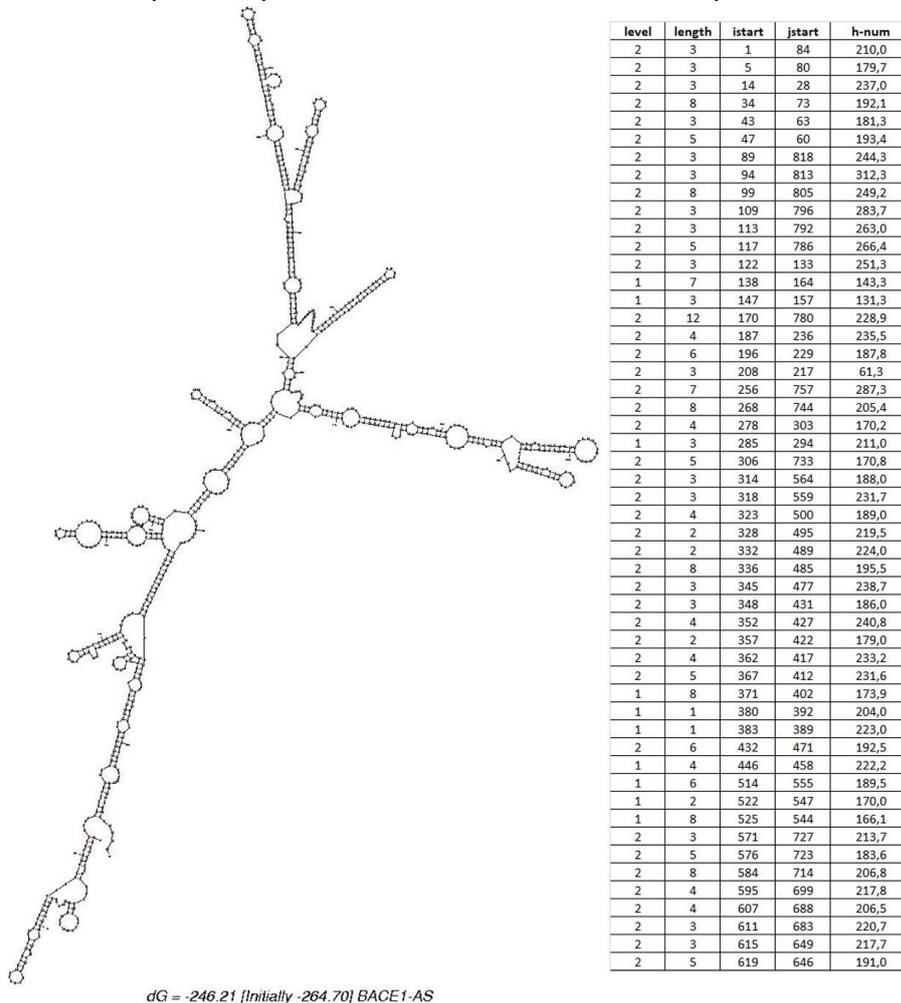
A estrutura selecionada possui hélices bem definidas, mostradas pelo arquivo “*h-num*”. A estrutura possui hélices nível 1 e 2. O nível 1 determina que as hélices que formam a estrutura secundária são mais estáveis, contribuindo para maior estabilidade da estrutura de RNA. O nível 2 determina que as hélices continuam estáveis, não tão estáveis se comparadas com a do nível 1, porém mais estáveis que os níveis 3 e 4.

A estrutura não é formada apenas por hélices ideais, porém ainda possui hélices estáveis baseadas nos níveis do “*h-num*”, encontrados ao final da tabela mostrada na Figura 10. Caso fosse modelada a estrutura apenas com hélices ideais, a estrutura não seria a ideal pois a estrutura que possui todas as hélices ideais possui energia livre mínima com valor mais alto se comparada com a estrutura selecionada.

A estrutura nº 5 pode ser considerada a estrutura de BACE1-AS por possuir a menor energia livre mínima comparada às outras geradas pela ferramenta e também por possuir as hélices mais confiáveis.

Na Figura 9, pode-se observar alguns dos dados gerados pelo Mfold acompanhada da estrutura secundária nº5, selecionada para representar o BACE1-AS. Existem na tabela ao lado da estrutura, algumas informações sobre a formação da estrutura secundária de BACE1-AS. A coluna “*level*” é baseada na classificação da ferramenta para as hélices, a coluna “*length*” é o comprimento da hélice, “*istart*” e “*jstart*” representam o pareamento dos primeiros pares de base da hélice e o valor “*h-num*” para cada hélice formada

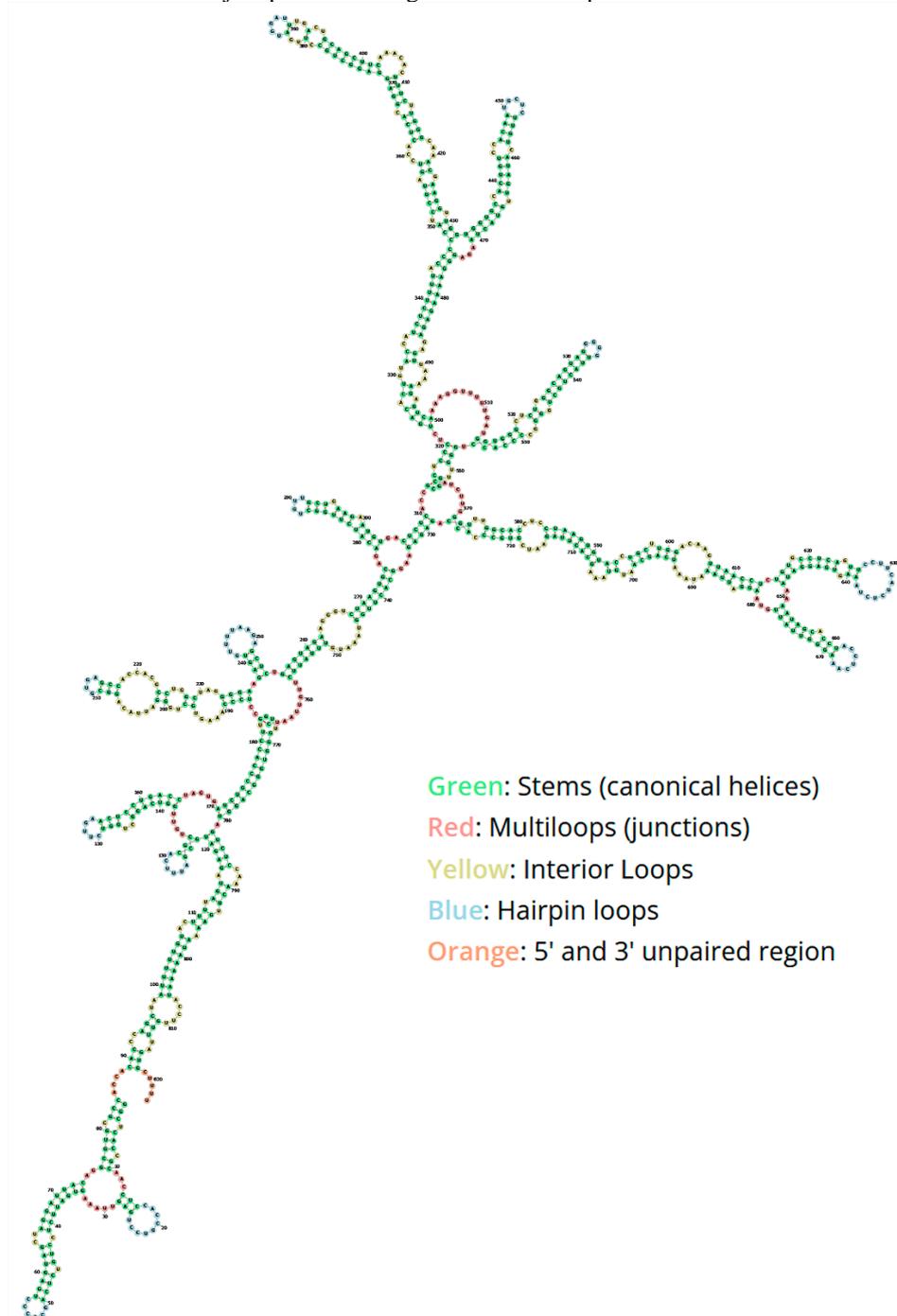
Figura 9 - **Estrutura secundária e h-num do lncRNA BACE1-AS**. Essa é a representação da estrutura secundária modelada na ferramenta Mfold, juntamente com os valores dos arquivos brutos gerados. A coluna “*level*” é a classificação da ferramenta para as hélices, a coluna “*length*” é o comprimento da hélice, “*istart*” e “*jstart*” representam o pareamento dos primeiros pares de base da hélice e o valor “*h-num*” para cada hélice formada.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Na estrutura secundária desse RNA podem ser encontrados 61 hélices, 31 *loops* internos, 12 *bulge loops*, 12 grampos, 8 *multi-loops* e 1 *loop* externo. A presença dessa quantidade de elementos estruturais na estrutura secundária possibilita interações do lncRNA com outras moléculas, sendo os grampos, um elemento importante para interações do lncRNA. Estruturas secundárias sem elementos estruturais possuem mais dificuldade em interagir com outras moléculas. A Figura 10, gerada na ferramenta de visualização de RNAs FORNA (Kerpedjiev et al., 2015), possibilita a análise visual dos elementos estruturais, em diferentes cores, presentes na estrutura secundária.

Figura 10 - **Estrutura secundária com elementos secundários coloridos.** Essa é a representação da estrutura secundária de BACE1-AS com seus respectivos elementos secundários em diferentes cores. A cor verde representa hélices, formadas por pareamento das bases. A cor vermelha representa os *multiloops*, formados por uma região onde três ou mais hélices se juntam. A cor amarela representa os *loops* internos, formados por regiões sem pareamento de bases. A cor azul representa os grampos, formados por emparelhamento de bases seguida de um *loop* interno terminal. A cor laranja representa as regiões 5' e 3' sem pareamento de bases.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

4.2. ESTRUTURA SECUNDÁRIA 51A

A ferramenta Mfold gerou como resultado 9 estruturas secundárias para o lncRNA 51A que foram obtidas por meio de sua sequência primária. Na Tabela 2, é possível observar o

número de estruturas modeladas na ferramenta na coluna “Estrutura”, a classificação encontrada na coluna “classificação”, que são baseadas na energia livre mínima (kcal/mol) de cada estrutura.

Tabela 2 - **Classificação de energias das estruturas secundárias do 51A.** Essas são as classificações das estruturas secundárias modeladas baseada na energia livre mínima de cada uma. As maiores colocações possuem menor energia livre mínima.

Colocação	Energia livre mínima (kcal/mol)	Estrutura
1	-64.13	1
2	-58.79	3
3	-58.59	2
4	-58.26	9
5	-56.48	5
6	-55.62	8
7	-54.45	4
8	-53.54	7
9	-51.87	6

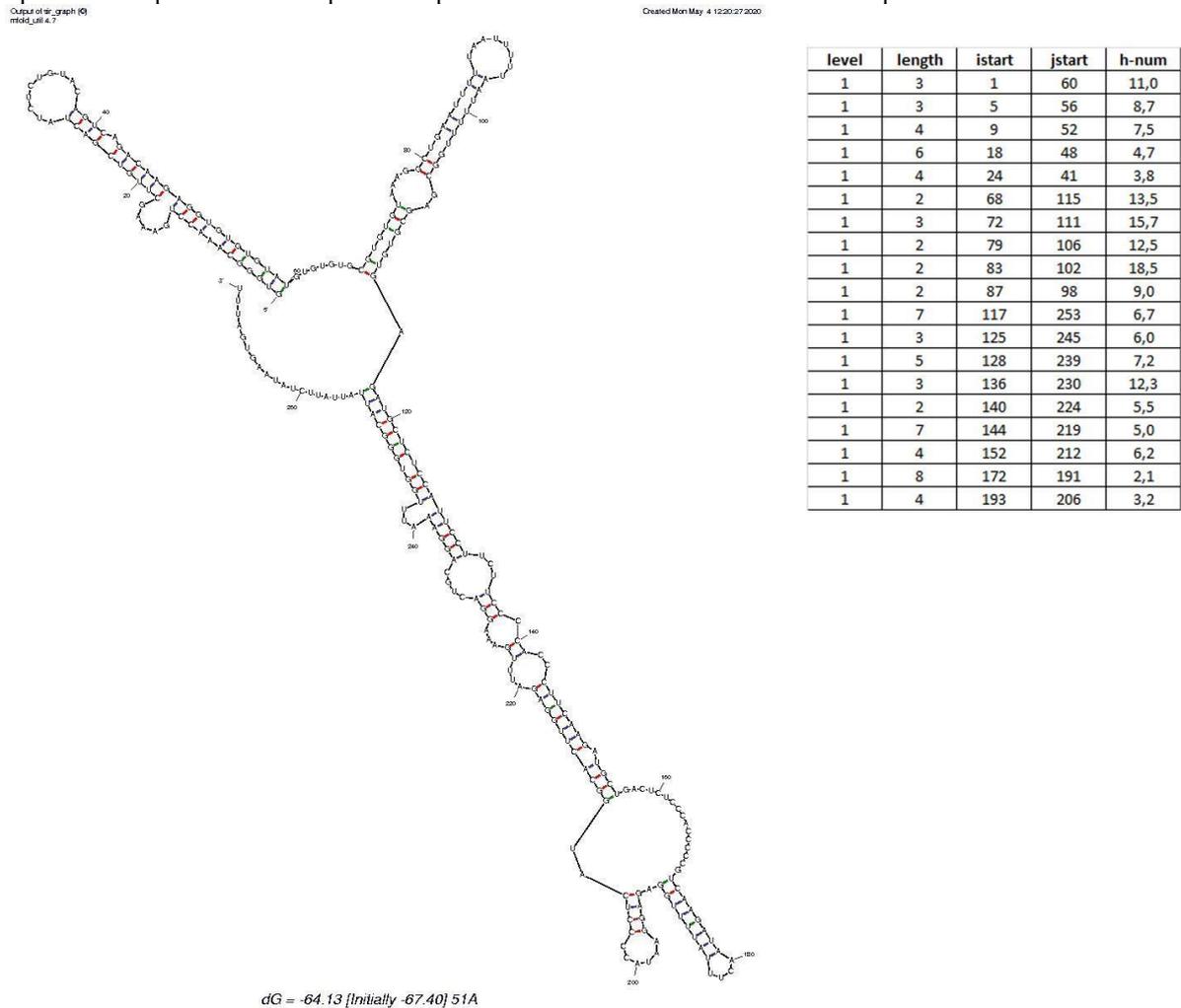
Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

A estrutura secundária selecionada para representar o lncRNA 51A foi a estrutura nº1, sendo essa estrutura a primeira na classificação na tabela acima. A ferramenta gerou para essa estrutura a energia livre mínima -64.13 kcal/mol. As estruturas subótimas geradas pelo Mfold foram analisadas, porém nenhuma se equiparou com a estrutura nº1. A estrutura nº1 possui ligações com a energia livre mínima ideal. Além da energia livre mínima, a estrutura também possui os melhores níveis de hélices.

A estrutura possui hélices nível 1, as hélices nível 1 determinam que são as mais estáveis, sendo as hélices ideais para a estrutura. Além de possuir hélices ideais, os valores *h-num* de cada hélice são consideravelmente baixos se comparado com as outras, o que complementa o nível de estabilidade dessas hélices. Assim, a primeira estrutura secundária é a que pode mais se assemelhar à estrutura do lncRNA 51A.

Na Figura 11 está a representação de estrutura secundária selecionada para o lncRNA 51, a estrutura classificada como nº1 da ferramenta Mfold. Também estão contidos na Figura 11, os valores *h-num* e os níveis de cada hélice formada na estrutura.

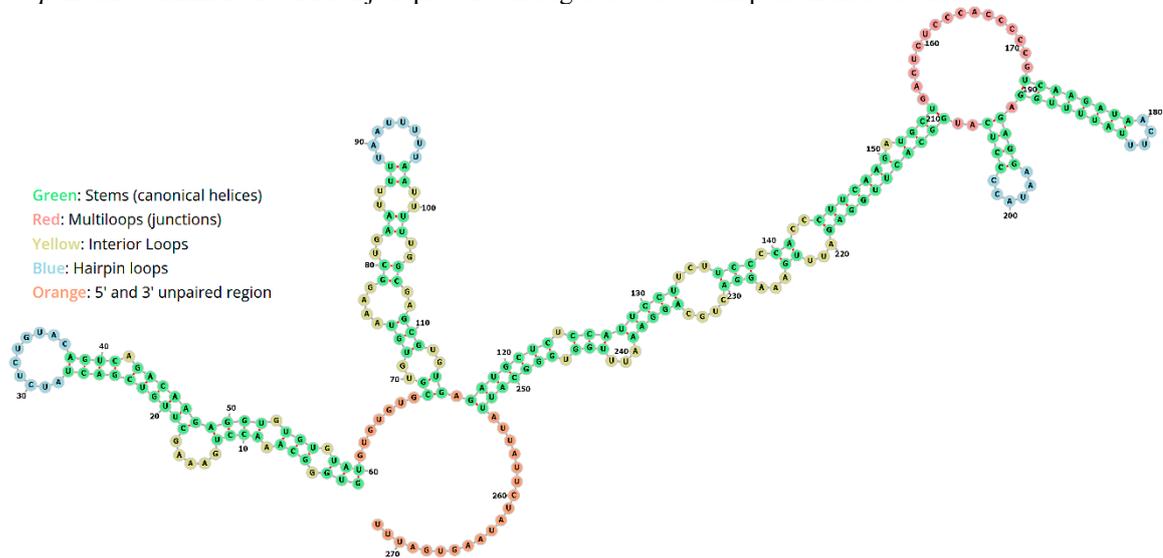
Figura 11 - **Estrutura secundária e h-num** do lncRNA 51A. A figura representa estrutura secundária nativa modelada para o lncRNA 51A, juntamente com os valores dos arquivos brutos gerados. A coluna “*level*” é a classificação da ferramenta para as hélices, a coluna “*length*” é o comprimento da hélice, “*istart*” e “*jstart*” representam o pareamento dos primeiros pares de base da hélice e o valor “*h-num*” para cada hélice formada.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Na estrutura secundária do lncRNA 51A podem ser encontrados 19 hélices, 10 *loops* internos, 4 *bulge loops*, 4 grampos, 2 *multi-loops* e 1 *loop* externo. A presença dos elementos estruturais, principalmente dos grampos, possibilita a interação desse lncRNA com outras moléculas. Na Figura 12, é possível observar a posição em que se encontram os elementos estruturais que podem ser encontrados na estrutura secundária selecionada do lncRNA 51A.

Figura 12 - **Estrutura secundária do 51A com elementos secundários coloridos.** Essa é a representação da estrutura secundária de 51A com seus respectivos elementos secundários em diferentes cores. A cor verde representa hélices, formadas por pareamento das bases. A cor vermelha representa os *multiloops*, formados por uma região onde três ou mais hélices se juntam. A cor amarela representa as *loops* internos, formados por regiões sem pareamento de bases. A cor azul representa os grampos, formados por emparelhamento de bases seguida de um *loop* interno terminal. A cor laranja representa as regiões 5' e 3' sem pareamento de bases.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

4.3. ESTRUTURA SECUNDÁRIA 17A

A ferramenta Mfold resultou em onze estruturas secundárias para a sequência primária lncRNA 17A. A sequência primária do lncRNA 17A possui 156 nucleotídeos e é a menor das sequências estudadas. Na Tabela 3, é possível observar as estruturas resultantes da ferramenta e a classificação em que estão baseadas na energia livre mínima (kcal/mol) de cada estrutura.

Tabela 3 - **Classificação de energias das estruturas secundárias do 17A.** Essas são as classificações das estruturas secundárias modeladas baseada na energia livre mínima de cada uma. As maiores colocações possuem menor energia livre mínima.

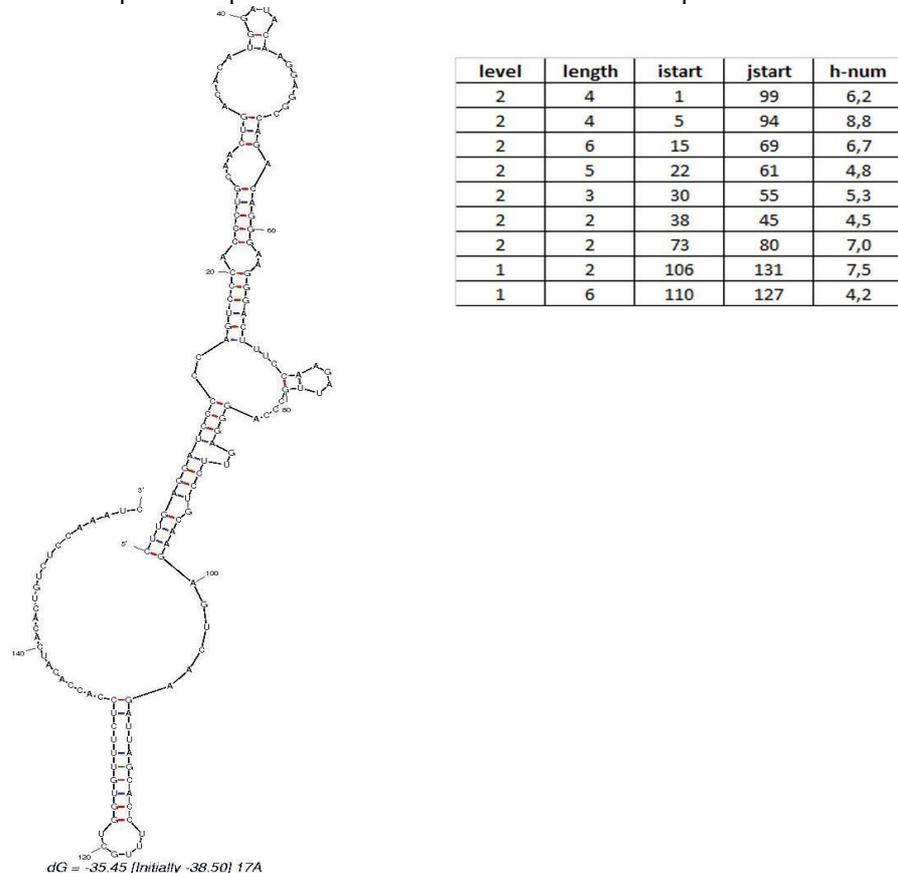
Classificação	Energia livre mínima (kcal/mol)	Estrutura
1	-35.45	2
2	-35.25	4
3	-34.83	3
4	-34.57	7
5	-34.15	10
6	-33.34	11
7	-33.19	9
8	-31.20	8
9	-31.12	1
10	-30.52	5
11	-30.12	6

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Após as análises das estruturas secundárias geradas pela ferramenta Mfold, a estrutura secundária selecionada para o 17A foi a estrutura nº2. Essa estrutura secundária possui ligações com a energia livre subótimas geradas pela ferramenta, resultando em uma estrutura de -35.45 kcal/mol, sendo esse o menor valor de energia livre mínima dentre todas as estruturas geradas pela ferramenta para esse lncRNA.

A estrutura selecionada possui hélices bem definidas e subótimas, mostradas pelo arquivo “*h-num*”. A estrutura possui hélices nível 1 e 2, as hélices nível 1 determinam que elas são mais bem definidas e estáveis, o nível 2 determina que as hélices ainda continuam bem definidas. Se caso houvesse apenas com hélices ideais, a estrutura não seria a ideal, pois a energia livre mínima seria mais alta do que a estrutura selecionada. Dessa forma, a estrutura nº2 é a estrutura secundária que se mais se assemelha ao lncRNA 17A. Os valores *h-num* e níveis de cada hélice podem ser observados na Figura 13, acompanhado da representação de estrutura secundária selecionada para o lncRNA 17A.

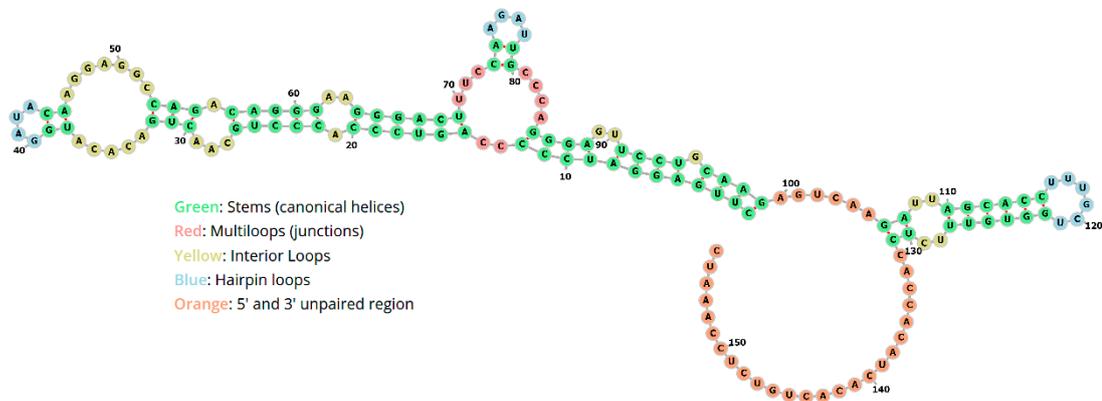
Figura 13 - **Estrutura secundária e h-num do lncRNA 17A.** A figura representa estrutura secundária nativa modelada para o lncRNA 17A, juntamente com os valores dos arquivos brutos gerados. A coluna “*level*” é a classificação da ferramenta para as hélices, a coluna “*length*” é o comprimento da hélice, “*istart*” e “*jstart*” representam o pareamento dos primeiros pares de base da hélice e o valor “*h-num*” para cada hélice formada.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Na estrutura secundária desse RNA podem ser encontrados 10 hélices, 4 *loops* internos, 2 *bulge loops*, 3 grampos, 1 *multi-loops* e 1 *loop* externo. A presença de 3 grampos na estrutura secundária de 17A, possibilita interações com outras moléculas. Também deve-se atentar a fita sem pareamentos ao final da sequência do lncRNA 17A, essa fita pode possibilitar pareamentos com outros RNAs por meio da complementaridade de bases. Na Figura 26, é possível observar a posição onde os elementos estruturais secundários podem ser encontrados na estrutura secundária selecionada para o lncRNA 17A.

Figura 14 - **Estrutura secundária do 17A com elementos secundários coloridos.** É a representação da estrutura secundária de 17A com seus respectivos elementos secundários em diferentes cores. A cor verde representa hélices, formadas por pareamento das bases. A cor vermelha representa os *multiloops*, formados por uma região onde três ou mais hélices se juntam. A cor amarela representa os *loops* internos, formados por regiões sem pareamento de bases. A cor azul representa os grampos, formados por emparelhamento de bases seguida de um *loop* interno terminal. A cor laranja representa as regiões 5' e 3' sem pareamento de bases.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

4.4. ESTRUTURA SECUNDÁRIA NDM29.

A ferramenta Mfold resultou em 19 estruturas secundárias para a sequência primária do lncRNA NDM29. A sequência primária do lncRNA NDM29 é a segunda maior dos lncRNAs estudados. Na Tabela 4, é possível observar as estruturas resultantes da ferramenta e a colocação em que estão baseadas na energia livre mínima (kcal/mol) de cada estrutura.

Tabela 4 - **Classificação de energias das estruturas secundárias do NDM29.** Essas são as classificações das estruturas secundárias modeladas baseada na energia livre mínima de cada uma. As maiores colocações possuem menor energia livre mínima.

(continua)

Classificação	Energia livre mínima (kcal/mol)	Estrutura
1	-122.98	2
2	-120.69	3
3	-118.69	1
4	-118.73	6
5	-117.19	8
6	-115.83	6

(continuação)

Classificação	Energia livre mínima (kcal/mol)	Estrutura
7	-115.39	12
8	-115.23	5
9	-113.08	9
10	-112.89	17
11	-112.58	18
12	-111.50	9
13	-111.10	13
14	-110.98	19
15	-110.92	16
16	-109.00	14
17	-108.88	10
18	-108.10	11
19	-107.92	15

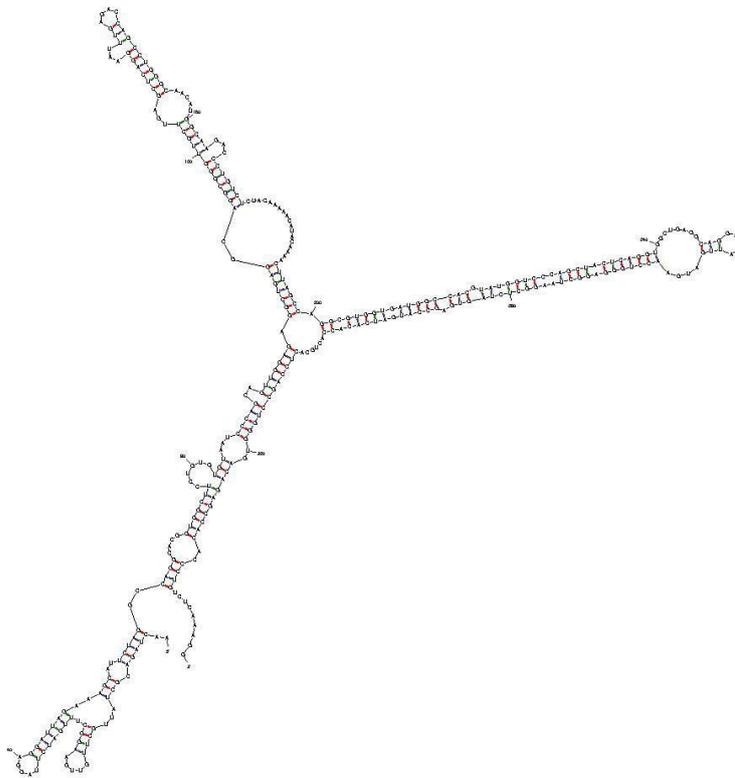
Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

(conclusão)

Após as análises de todas as estruturas geradas pela ferramenta Mfold, a estrutura selecionada para o lncRNA 51A foi a estrutura nº2. A classificação em primeira é devido a sua energia livre mínima menor. Essa estrutura possui interações com a energia livre subótimas geradas pela ferramenta, resultando em uma estrutura de -122.98 kcal/mol, sendo esse, o menor valor de energia livre mínima.

A estrutura possui hélices nível 1 e 2, as hélices nível 1 determinam que elas são as ideais e são as mais bem definidas, o nível 2 determina que as hélices ainda continuam bem definidas, mas não são as ideais como as ideais no nível 1. A estrutura não possui todas as hélices nível 1, porém, permanece com hélices estáveis baseadas nos níveis do “*h-num*”. Assim como em análises anteriores, se caso fosse modelada uma estrutura apenas com hélices nível 1, a estrutura não seria a ideal, pois a energia livre mínima da própria seria mais alta do que a estrutura selecionada, como no caso da estrutura nº 1. Dessa forma, a estrutura nº2 resultante da ferramenta é a estrutura secundária que se mais se assemelha ao lncRNA NDM29. Os níveis e os valores *h-num* de cada hélice podem ser observados na tabela que acompanha a representação da estrutura secundária nº2 na Figura 15.

Figura 15 - **Estrutura secundária e h-num do lncRNA NDM29.** A figura representa estrutura secundária nativa modelada para o lncRNA NDM29, juntamente com os valores dos arquivos brutos gerados. A coluna “*level*” é a classificação da ferramenta para as hélices, a coluna “*length*” é o comprimento da hélice, “*istart*” e “*jstart*” representam o pareamento dos primeiros pares de base da hélice e o valor “*h-num*” para cada hélice formada.

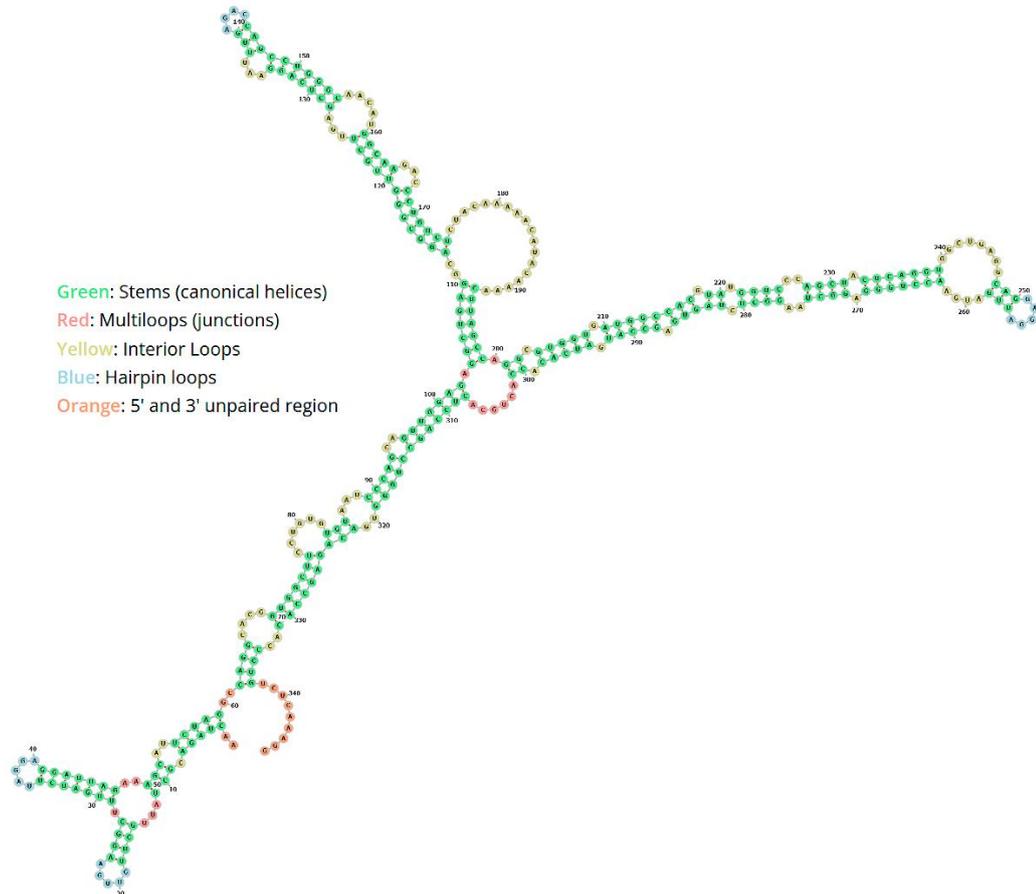


level	length	istart	jstart	h-num
1	5	3	59	17,8
1	3	9	52	18,0
1	4	15	27	23,0
1	4	62	337	19,8
1	7	70	331	11,0
1	3	83	324	13,0
1	5	89	319	10,2
1	7	96	314	12,1
1	7	104	199	27,0
1	7	113	174	25,0
1	5	120	164	23,6
1	7	128	154	13,6
1	3	138	147	14,7
2	2	201	301	22,5
2	5	204	298	17,4
2	5	210	292	9,8
2	3	215	286	10,0
2	2	219	283	12,0
2	4	222	280	25,8
2	4	228	274	25,2
2	7	233	269	23,7
2	3	248	258	36,0

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

A estrutura secundária do lncRNA NDM29, por ser a segunda maior sequência primária do estudo, possui uma grande quantidade de elementos estruturais secundários. Na estrutura secundária desse RNA podem ser encontrados 26 hélices, 11 *loops* internos, 6 *bulge loops*, 4 grampos, 2 *multi-loops* e 1 *loop* externo. A presença dos grampos e de uma quantidade considerável de *loops* internos demonstra que a estrutura secundária de NDM29 tem motivos de interação que podem ser utilizados para interação com outras moléculas. Na Figura 16, é possível observar o local onde os elementos estruturais podem ser encontrados na estrutura secundária selecionada para representar o lncRNA NDM29.

Figura 16 - **Estrutura secundária do NDM29 com elementos secundários coloridos.** A cor verde representa hélices, formadas por pareamento das bases. A cor vermelha representa os *multiloops*, formados por uma região onde três ou mais hélices se juntam. A cor amarela representa os *loops* internos, formados por regiões sem pareamento de bases. A cor azul representa os grampos, formados por emparelhamento de bases seguida de um *loop* interno terminal. A cor laranja representa as regiões 5' e 3' sem pareamento de bases.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

4.5. ESTRUTURA TERCIÁRIA BACE1-AS.

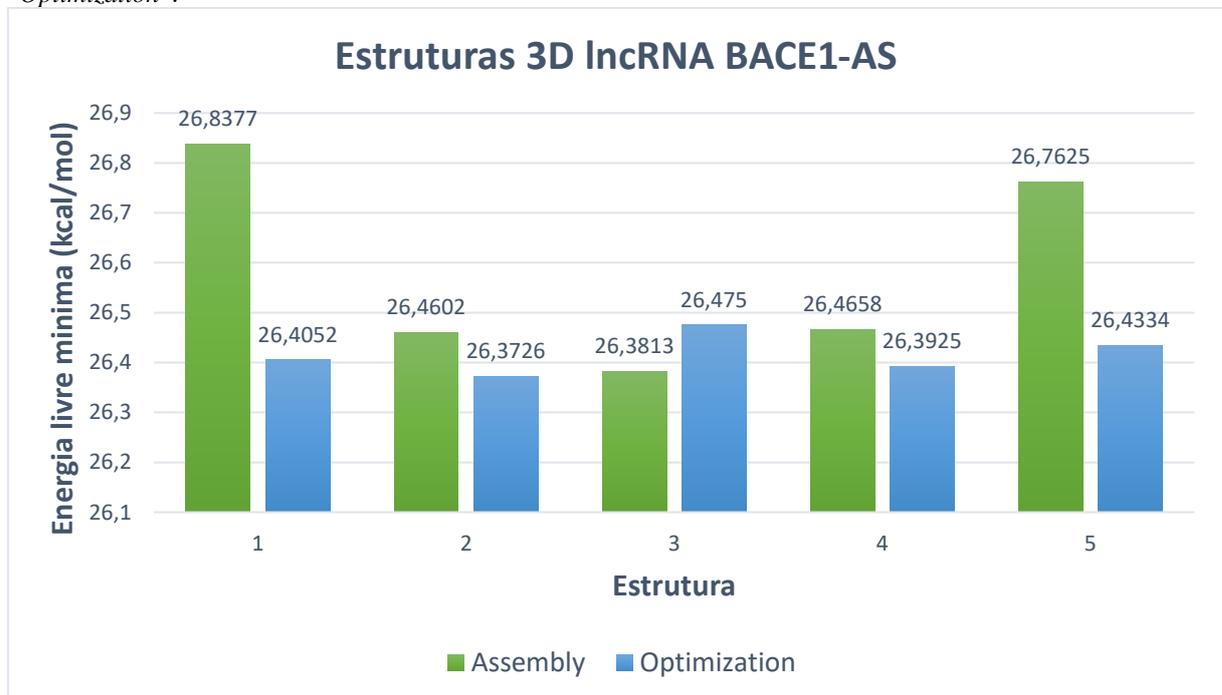
A modelagem das estruturas terciárias dos lncRNAs foi realizada por meio do software 3dRNA (Wang et al., 2019). Para que a modelagem possa ser realizada, a ferramenta necessita de dados de entrada, que são a sequência primária do lncRNA desejado no formato FASTA, nesse caso são os estudados no projeto, e também as informações sobre a estrutura secundária que foi modelada na ferramenta Mfold, utilizando o formato *dot-bracket notation*.

A modelagem da estrutura terciária de BACE1-AS resultou em cinco estruturas em duas funções da ferramenta 3dRNA, sendo elas as funções “*Assembly*” e “*Optimization*”, totalizando dez estruturas. As estruturas selecionadas para as análises foram obtidas por meio da função “*Optimization*”, por serem as estruturas que passaram por otimização e refinamento. Cada estrutura terciária modelada na ferramenta 3dRNA possui seu respectivo valor de energia livre mínima.

As estruturas modeladas são classificadas de 1 a 5 pelo 3dRNAscore (Wang et al., 2015), sendo a primeira estrutura da classificação, a estrutura que possui os melhores modelos 3D pertencentes a biblioteca de elementos estruturais da ferramenta. Além disso, a primeira estrutura da classificação da ferramenta possui maior semelhança com os elementos secundários pequenos que formam a estrutura secundária utilizada como dado de entrada. Dessa forma, a primeira estrutura da classificação é considerada a estrutura com maior confiabilidade.

A estrutura com a menor energia livre mínima gerada para o BACE1-AS foi a segunda estrutura otimizada, possuindo 26.3666 kcal/mol. Como a estrutura está em segundo lugar na classificação definida pela ferramenta, essa estrutura ainda possui elementos secundários semelhantes à estrutura secundária, devido a sua classificação. Na Figura 17 é possível observar as diferenças de energia livre mínimas geradas pela ferramenta 3dRNA para cada estrutura modelada, em cada coluna representa uma estrutura, sendo as estruturas em verde as não otimizadas e as azuis as estruturas otimizadas.

Figura 17 - **Gráfico de comparação dos valores de energia das estruturas terciárias de BACE1-AS.** O gráfico exemplifica os valores de energia livre mínima de cada estrutura 3D gerada para BACE1-AS. As colunas em verde representam as estruturas da função “Assembly” e as colunas em azul representam as estruturas da função “Optimization”.

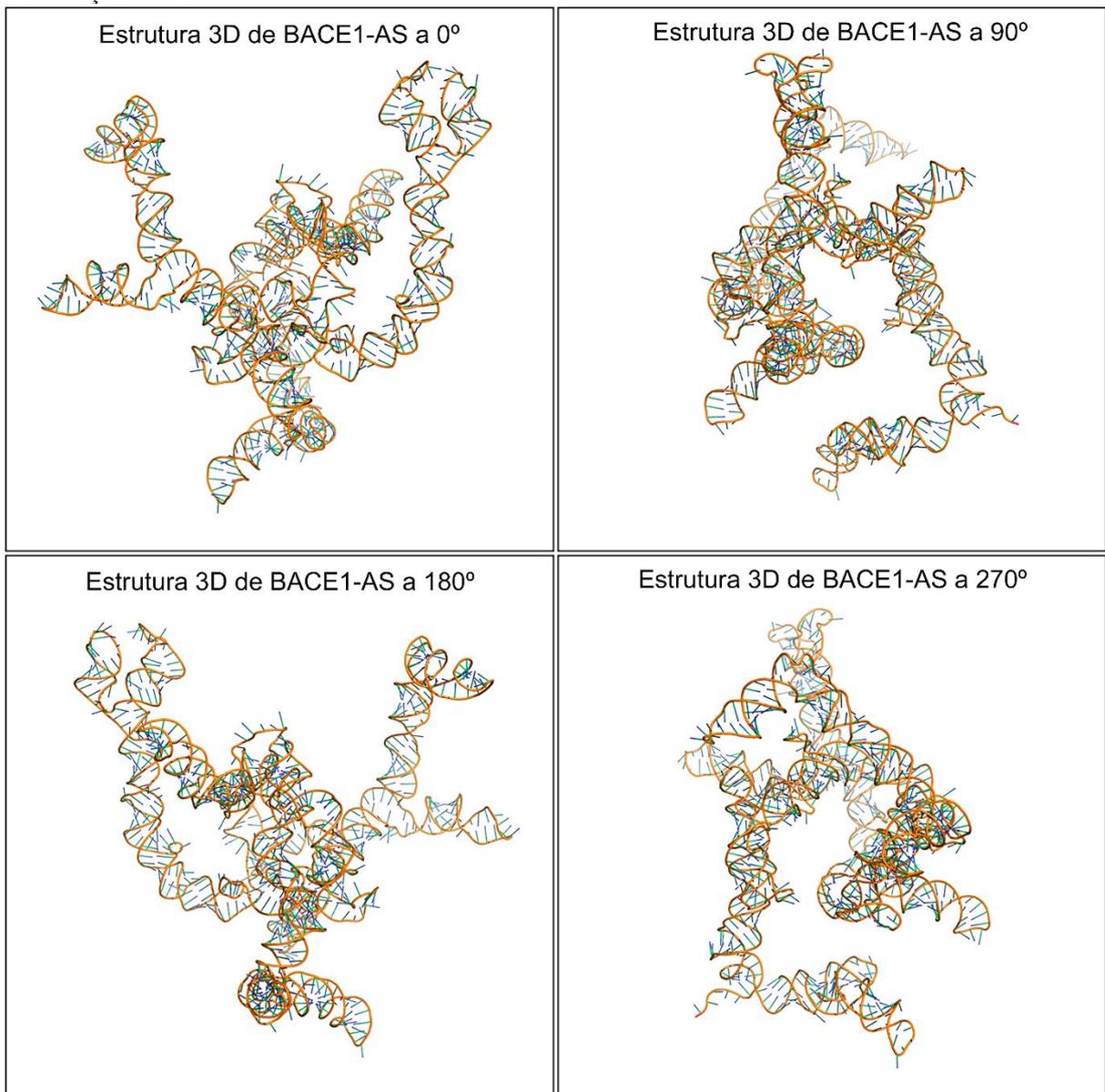


Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Baseado na energia mínima livre, a segunda estrutura otimizada é a estrutura terciária que mais se assemelha à estrutura de BACE1-AS, sendo que sua energia livre mínima é a menor gerada pela ferramenta. Em questão da modelagem da estrutura, a primeira estrutura possui os melhores elementos estruturais da biblioteca, porém, a segunda ainda possui um alto nível de

elementos estruturais, diferente das estruturas com classificação mais baixa no 3dRNAscore. Dessa forma, foi preferível selecionar a segunda estrutura terciária da classificação, por possuir a menor energia livre mínima se comparada às outras estruturas modeladas na ferramenta e também por possuir elementos estruturais de alto nível provenientes da biblioteca específica do software. Na figura 18 pode-se observar a estrutura terciária selecionada para BACE1-AS em diferentes ângulos, isso proporciona uma visualização melhor da molécula.

Figura 18 - **Estrutura 3D de BACE1-AS em diferentes ângulos.** Essa coleção de imagens mostra a estrutura 3D escolhida para representar a estrutura de BACE1-AS. Os diferentes ângulos expostos auxiliam em uma visualização melhor da molécula.

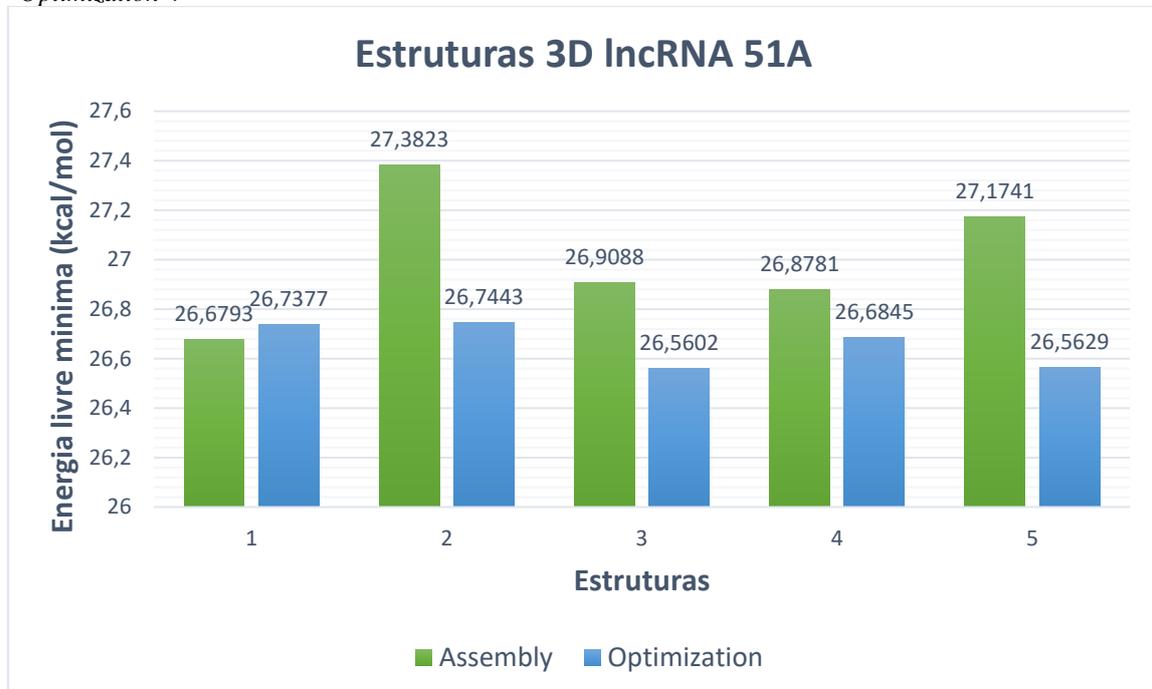


Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

4.6. ESTRUTURA TERCIÁRIA 51A.

Para o lncRNA 51A, a primeira estrutura gerada na função “*Optimization*” é a estrutura com os melhores elementos estruturais, podendo se assemelhar a estrutura terciária do lncRNA. A estrutura selecionada possui 26.7377 kcal/mol. Na Figura 39 é possível observar as respectivas energias de cada estrutura modelada, representadas nas colunas, modeladas por meio da ferramenta 3dRNA. As colunas representam as estruturas da função “*Assembly*” e “*Optimization*”. O gráfico compara a energia de cada estrutura gerada por essas funções.

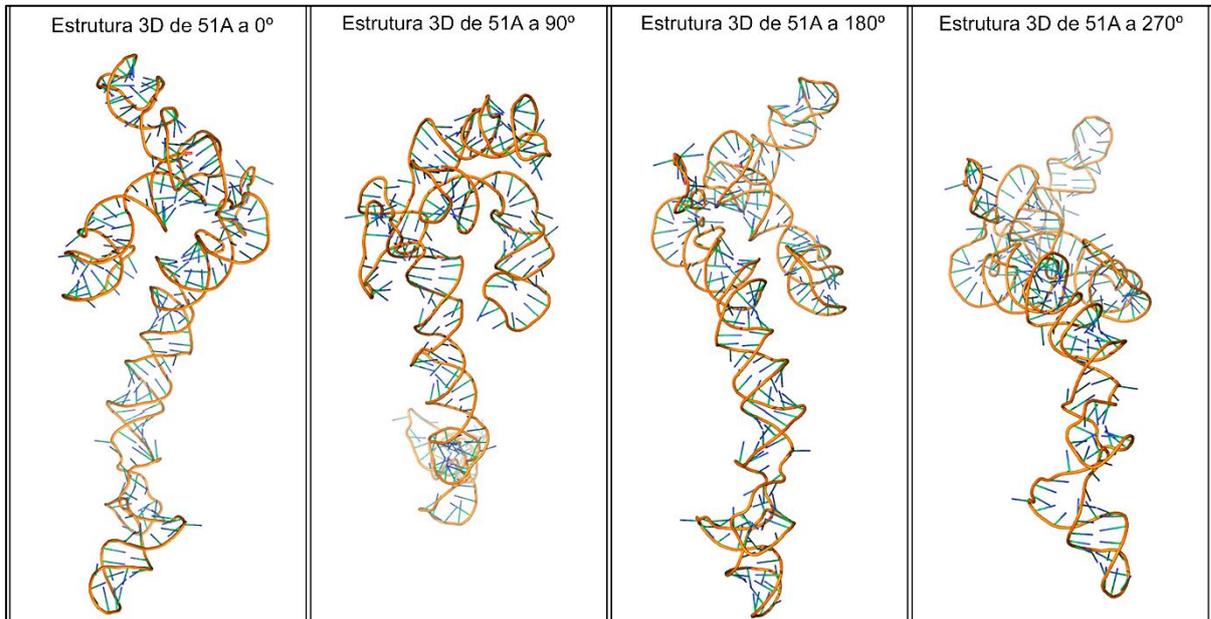
Figura 19 - Gráfico de comparação dos valores de energia das estruturas terciárias de 51A. O gráfico exemplifica os valores de energia livre mínima de cada estrutura 3D gerada para 51A. As colunas em verde representam as estruturas da função “*Assembly*” e as colunas em azul representam as estruturas da função “*Optimization*”.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

É possível determinar que a primeira estrutura da função “*Optimization*” é a estrutura que mais se assemelha ao lncRNA 51A. O valor de energia livre mínima dessa estrutura não foi diminuído pela função de otimização, porém seus modelos 3D de elementos estruturais secundários foram otimizados e refinados, sendo semelhantes aos elementos encontrados na estrutura secundária. Dessa forma, a primeira estrutura da função “*Optimization*”, classificado pelo 3dRNAscore (Wang et al., 2015), foi a estrutura selecionada para representar a estrutura terciária de 51A. Sua energia livre mínima não é a mais baixa, porém, os elementos estruturais secundários são os que mais mantém a confiabilidade da estrutura secundária. Na figura 20, pode-se observar a estrutura terciária selecionada para representar a estrutura de 51A em diferentes ângulos, para que a molécula possa ser analisada em suas dimensões.

Figura 20 - **Estrutura 3D do 51A em diferentes ângulos.** Essa coleção de imagens mostra a estrutura 3D escolhida para representar a estrutura de 51A. Os diferentes ângulos expostos auxiliam em uma visualização melhor da molécula.

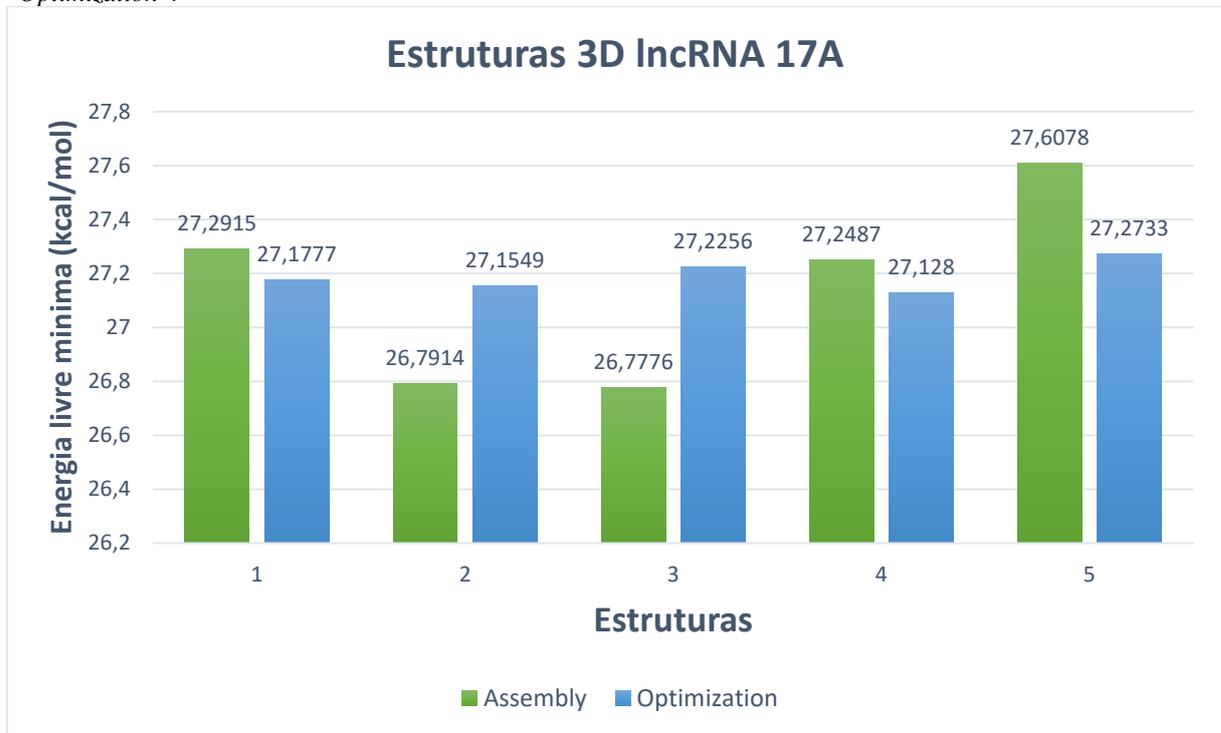


Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

4.7. ESTRUTURA TERCIÁRIA 17A.

A primeira estrutura da função “*Optimization*” foi selecionada para representar a estrutura terciária do lncRNA 17A. A estrutura possui 27.1777 kcal/mol. Assim como a modelagem do lncRNA 51A, foi mais adequado escolher essa a estrutura com os melhores modelos 3D para os elementos secundários pequenos, já que são modelos que possivelmente a estrutura do RNA formará. Na Figura 21 é possível observar as estruturas modeladas nas funções “*Assembly*” e “*Optimization*”, assim como as energias livres mínimas geradas.

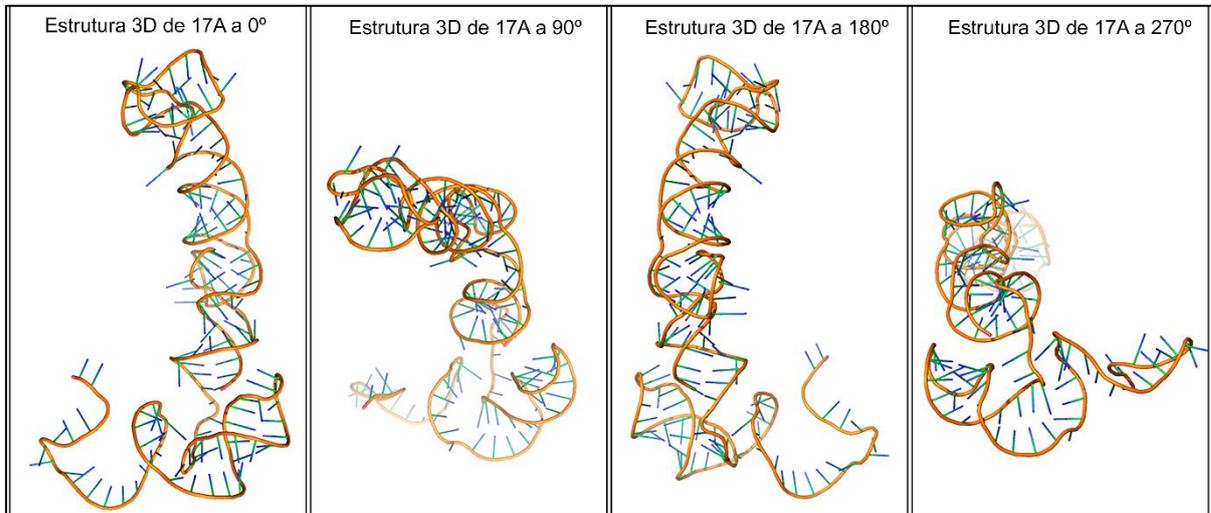
Figura 21 - Gráfico de comparação dos valores de energia das estruturas terciárias de 17A. O gráfico exemplifica os valores de energia livre mínima de cada estrutura 3D gerada para 17A. As colunas em verde representam as estruturas da função “Assembly” e as colunas em azul representam as estruturas da função “Optimization”.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Como a primeira estrutura modelada na função “Optimization” possui uma estrutura otimizada, refinada e energia livre mínima menor, se comparada a sua versão não otimizada, a primeira estrutura otimizada pode se assemelhar a estrutura do lncRNA 17A. Desse modo, é possível determinar que a primeira estrutura otimizada é a estrutura que mais mantém a confiabilidade com a estrutura secundária, possuindo os mesmos elementos estruturais secundários pertencentes a essa estrutura, sendo que as outras estruturas possuíam energias maiores e também modelos 3D para os elementos secundários com confiabilidade inferior. A representação da estrutura terciária do lncRNA 17A pode ser observada na Figura 22, onde é possível observar a estrutura terciária selecionada em diferentes ângulos

Figura 22 - **Estrutura 3D do 17A em diferentes ângulos.** Essa coleção de imagens mostra a estrutura 3D escolhida para representar a estrutura de 17A. Os diferentes ângulos expostos auxiliam em uma visualização melhor da molécula.

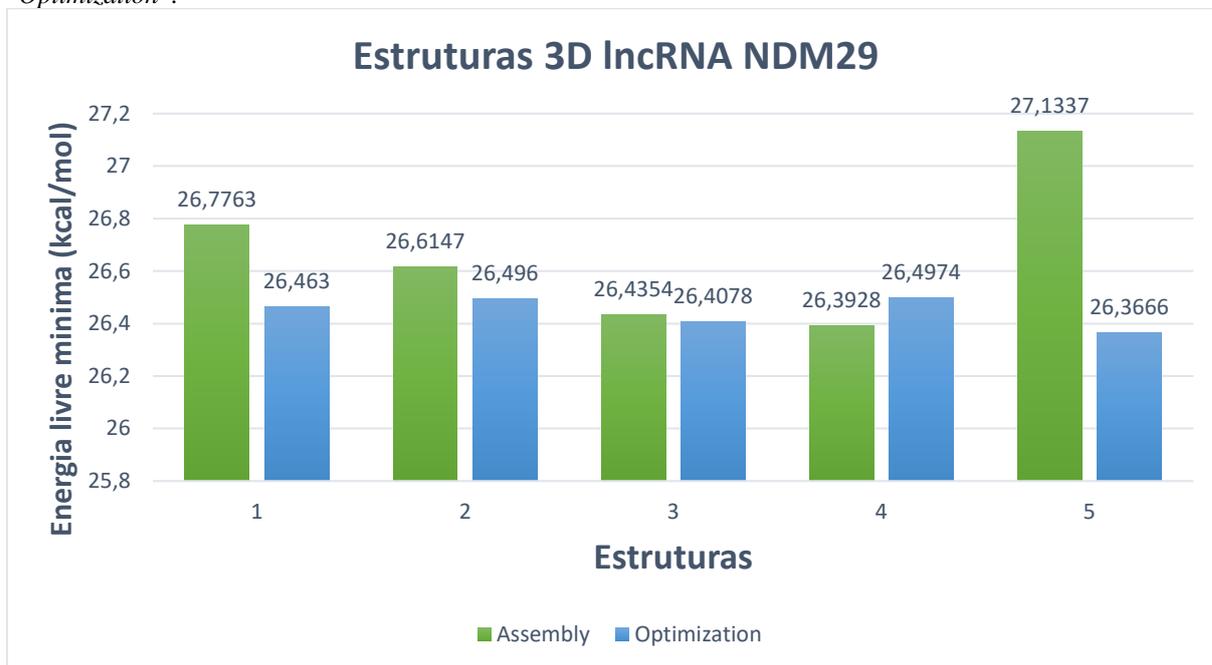


Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

4.8. ESTRUTURA TERCIÁRIA NDM29.

A estrutura com menor energia livre mínima foi a quinta estrutura da função “*Optimization*”, possuindo 26.3726 kcal/mol. Porém, como a estrutura possui modelos 3D com pouca confiabilidade com os elementos estruturais da estrutura secundária, a estrutura pode não se assemelhar com a estrutura do lncRNA NDM29, mesmo possuindo menor valor de energia livre mínima. A primeira estrutura comparada a quinta estrutura, possui diferença em suas conformações pela diferença de energia. Porém, como os modelos 3D da primeira estrutura ainda possuem semelhança maior com os elementos estruturais da estrutura secundária, essa estrutura pode se assemelhar a estrutura terciária do NDM29. Na Figura 23 é possível observar as estruturas modeladas e as energias livres mínimas geradas pela ferramenta 3dRNA.

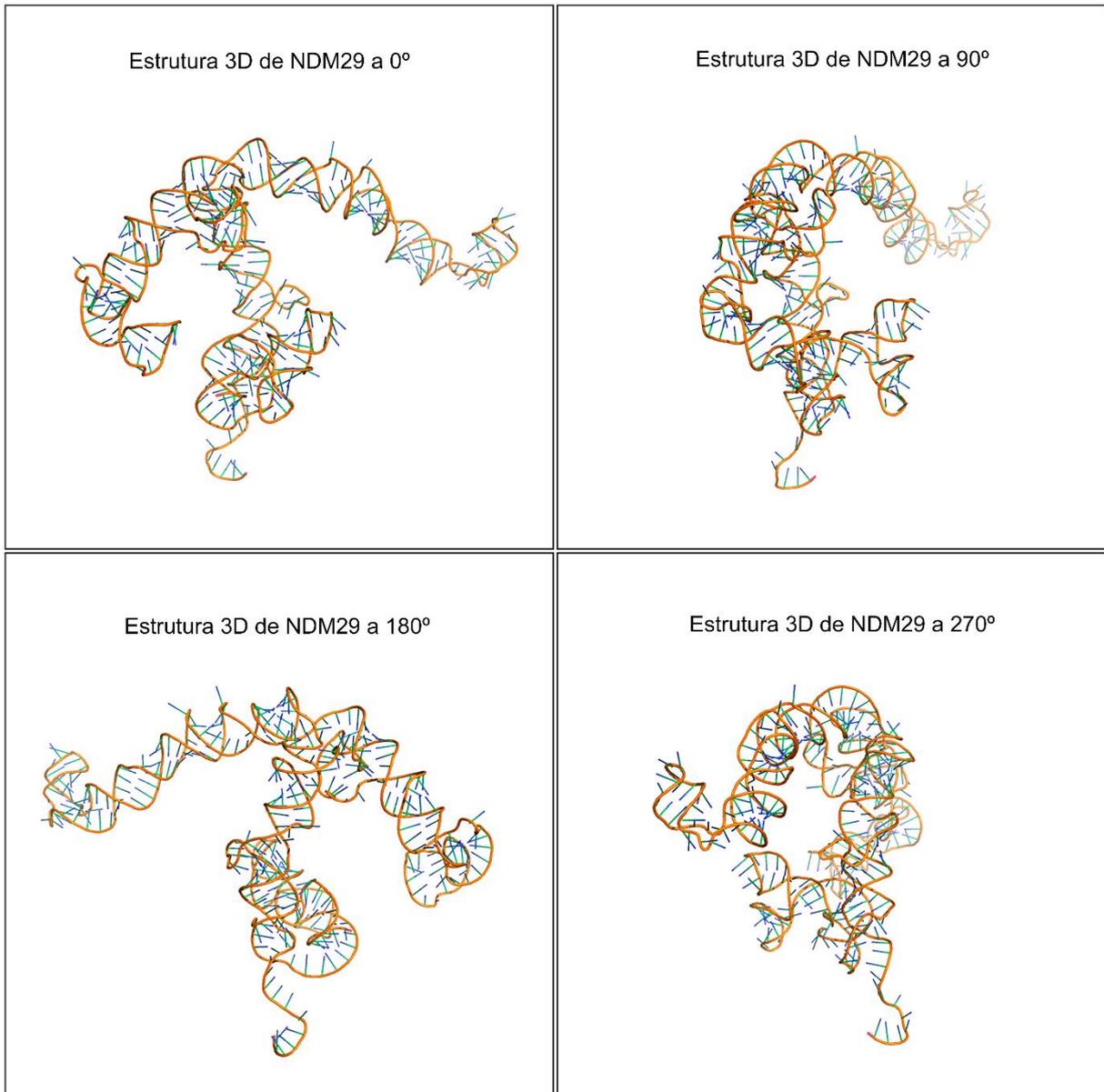
Figura 23 - Gráfico de comparação dos valores de energia das estruturas terciárias de NDM29. O gráfico exemplifica os valores de energia livre mínima de cada estrutura 3D gerada para NDM29. As colunas em verde representam as estruturas da função “Assembly” e as colunas em azul representam as estruturas da função “Optimization”.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Desse modo, foi preferível escolher a estrutura com os melhores modelos 3D para os elementos estruturais secundários, mesmo possuindo a energia livre mínima um pouco maior, já que a quinta estrutura possui modelos 3D inferiores por estar em último lugar na classificação do 3dRNAscore (Wang et al., 2015). A representação da estrutura terciária do IncRNA NDM29 pode ser observada na Figura 24, em diferentes posições para uma melhor análise visual.

Figura 24 - **Estrutura 3D do NDM29 em diferentes ângulos.** Essa coleção de imagens mostra a estrutura 3D escolhida para representar a estrutura de NDM29. Os diferentes ângulos expostos auxiliam em uma visualização melhor da molécula



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

4.9. INTERAÇÃO DE MIRNAS COM BACE1-AS.

Realizadas as modelagens, iniciou-se às buscas de miRNAs que podem interagir com os lncRNAs relacionados à DA e analisar seus locais de interação nas estruturas modeladas, com o objetivo de encontrar sítios específicos nas estruturas. A busca de miRNAs que interagem com BACE1-AS por meio da ferramenta lncBase v.3, resultou em 44 miRNAs, e pela ferramenta miRDB, foram encontrados 33 miRNAs. Para o RNA alvo do BACE1-AS, o mRNA BACE1, foram encontrados 25 miRNAs pela ferramenta TarBase v.8, 56 miRNAs pela ferramenta TargetScanHuman e 261 miRNAs pela ferramenta mirSystem.

Comparando os miRNAs obtidos por meio dessas ferramentas, foi possível encontrar 17 miRNAs que podem interagir com o BACE1 e o BACE1-AS, sendo que um miRNA pode interagir com as moléculas em diferentes locais nas sequências. Na Tabela 5, é possível observar as identificações dos miRNAs que interagem com BACE1 e BACE1-AS, a sequência onde se pareiam no BACE1-AS e a sequência alvo dos miRNAs no BACE1-AS.

Tabela 5 - **MicroRNAs que interagem com BACE1 e BACE1-AS.** A tabela mostra as identificações dos miRNAs que foram encontrados na busca de miRNAs que interagem com BACE1 e BACE1-AS. Os 17 miRNAs estão especificados na primeira coluna, baseado nas identificações mostradas nas ferramentas. Na segunda coluna estão as sequências de nucleotídeos onde os miRNAs interagem com BACE1-AS, sendo que um miRNA pode interagir em mais de uma sequência específica. Na última coluna está apresentada a sequência alvo que o miRNA interage com BACE1-AS por meio da complementaridade de bases.

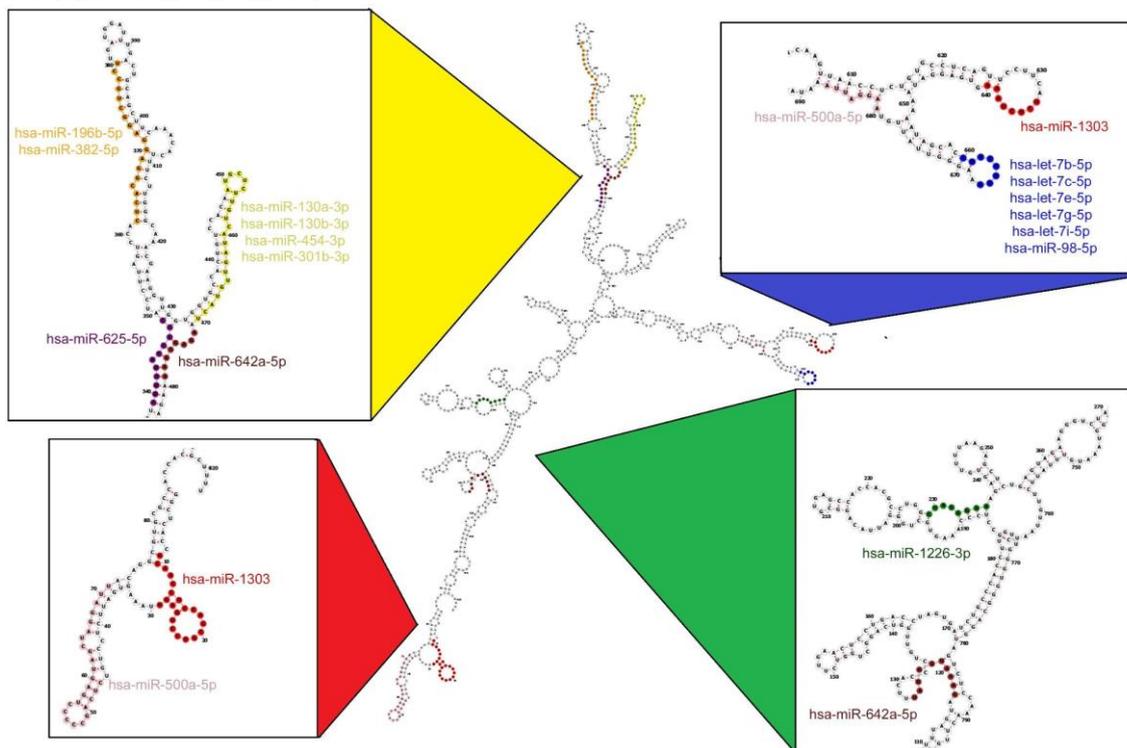
miRNA	Nucleotídeos BACE1-AS	Sequência alvo
hsa-let-7b-5p	660-667	CUACCUCA
hsa-let-7c-5p	660-667	CUACCUCA
hsa-let-7e-5p	660-667	CUACCUCA
hsa-let-7g-5p	660-667	CUACCUCA
hsa-let-7i-5p	660-667	CUACCUCA
hsa-miR-1226-3p	229-236	CUAGGGGA
hsa-miR-130a-3p	449-470	AUGCUCUUGUCAUAGUUGUACU
hsa-miR-130b-3p	449-470	AUGCUCUUGUCAUAGUUGUACU
hsa-miR-196b-5p	362-380	CUCACGGAGGAGGCUGCCU
hsa-miR-301b-3p	451-470	GCUCUUGUCAUAGUUGUACU
hsa-miR-382-5p	356-367	AGUCCACUCACG
hsa-miR-454-3p	451-471	GCUCUUGUCAUAGUUGUACUA
hsa-miR-625-5p	339-349	CUUUUACCCCC
hsa-miR-98-5p	660-667	CUACCUCA
hsa-miR-500a-5p	47-71	CUCAGCCCCCUGAGUAGCUAGGAUU
hsa-miR-500a-5p	680-687	AAGGAUUA
hsa-miR-1303	9-28	GCAACCUCACCGUCCUGAG
hsa-miR-1303	633-640	UCUCUAAA
hsa-miR-642a-5p	117-126	GAGAUGGGAU
hsa-miR-642a-5p	472-479	AGAGGGAA

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

A Figura 25 mostra os locais onde 17 microRNAs interagem na estrutura secundária de BACE1-AS. Na sequência de nucleotídeos 9-29, marcadas em vermelho, onde interage o miRNA *hsa-miR-1303*, podem ser encontrados 1 *multi-loop* e 1 grampo, elemento estrutural importante para interações com a estrutura do RNA. Na sequência de nucleotídeos 47-71, onde interage o miRNA *hsa-mir-500a-5p*, marcado em rosa, são encontrados 2 *loops* internos e 1 *bulge loop*. O *hsa-mir-500a-5p* também interage na sequência 680-687, marcado em rosa, onde existe um *bulge loop*. Na sequência entre os nucleotídeos 117-126, interage o miRNA *hsa-mir-642a-5p*, marcado em marrom, é encontrado 1 *loop* interno. Na sequência entre os nucleotídeos 226-236, local onde interage o miRNA *hsa-mir-1226-3p*, marcado em verde, é encontrado 1 *loop* interno. Na sequência entre os nucleotídeos 339-349, interage o miRNA *hsa-mir-625-5p*,

marcado em roxo, compõe um *multi-loop* e possui 1 *bulge loop*. Na sequência entre os nucleotídeos 362-380, marcado em laranja, interagem os miRNAs *hsa-miR-196b-5p* e *hsa-miR-382-5p* podem ser encontrados 2 *loops* internos e 1 *bulge loop*. Na sequência entre os nucleotídeos 449-470, marcado em amarelo, interagem os miRNAs *hsa-miR-130a-3p*, *hsa-miR-130b-3p*, *hsa-miR-301b-3p* e *hsa-miR-454-3p*, onde podem ser encontrados 2 *loops* internos e mais 1 grampo. Entre os nucleotídeos 633-640 há interação do miRNA *hsa-miR-1303*, marcado em vermelho, e essa interação cobre quase todo o grampo presente nessa sequência, demonstrando que esse grampo pode ser um local de interação ativa. Por final, entre os nucleotídeos 660-667 interagem 6 miRNAs diferentes, o que também pode aumentar as chances de a estrutura de grampo ser um local de interação ativo no BACE1-AS.

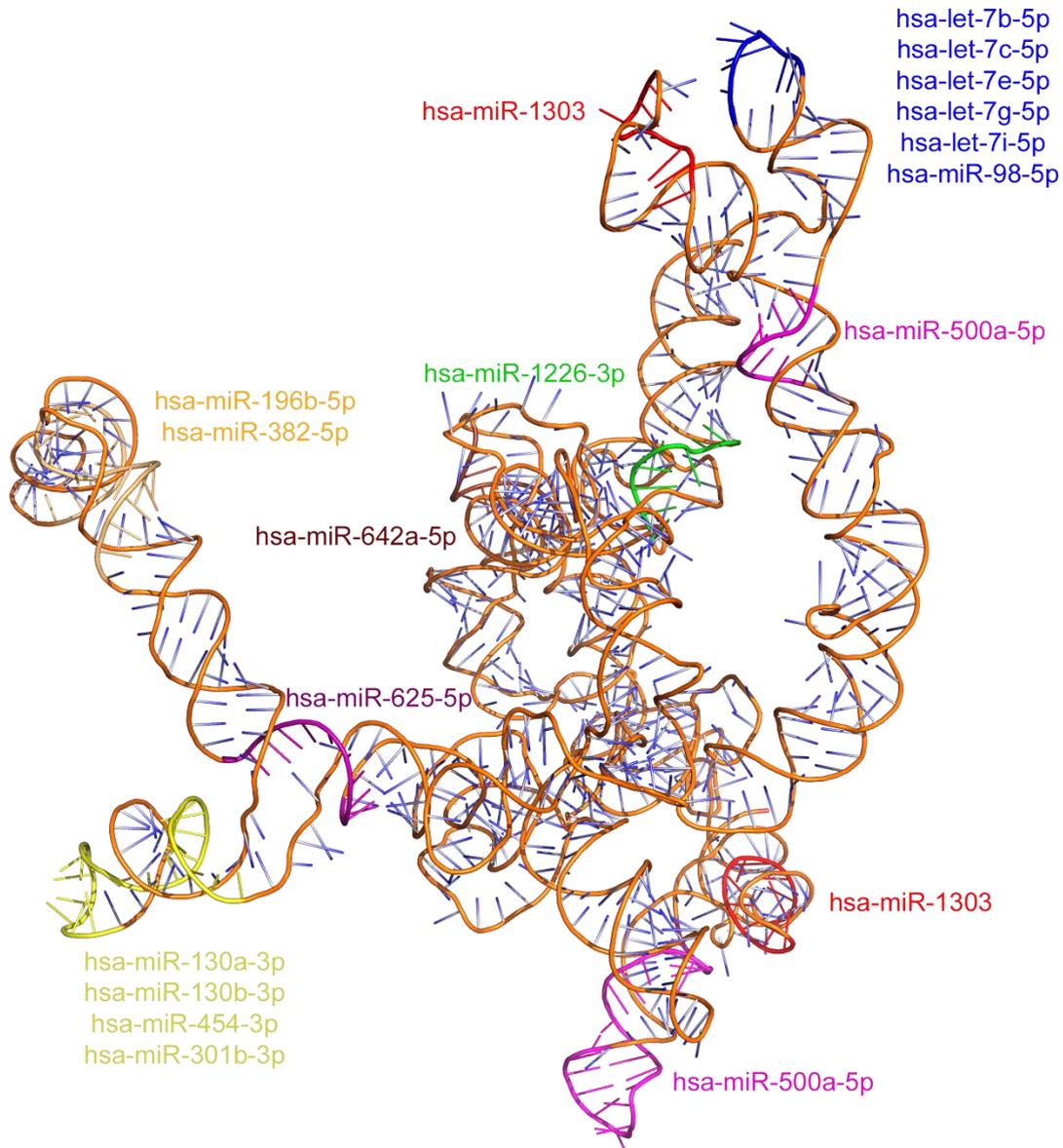
Figura 25 - **Locais de interação de miRNAs na estrutura secundária de BACE1-AS.** A figura apresenta os locais de interação dos miRNAs na estrutura secundária de BACE1-AS, esses miRNAs interagem com BACE1 e BACE1-AS. As sequências onde há interações e as identificações dos miRNAs que interagem nessas sequências estão coloridas com a mesma cor.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Na Figura 26, pode-se observar a estrutura terciária do lncRNA BACE1-AS e os locais de interação dos miRNAs nessa estrutura terciária. Foram mantidas as mesmas colorações encontradas na figura da estrutura secundária referente aos locais de pareamento nas estruturas.

Figura 26 - **Locais de interação de miRNAs na estrutura 3D de BACE1-AS.** A figura apresenta os locais de interação dos miRNAs que interagem com BACE1 e BACE1-AS, assim como a identificação dos miRNAs da interação. As cores representadas na estrutura secundária foram mantidas na estrutura terciária para comparação dos locais de interação da estrutura secundária e terciária



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

4.10. INTERAÇÃO DE MIRNAS COM 51A.

Os resultados obtidos para o lncRNA 51A, por meio da ferramenta miRDB, mostrou a possibilidade de interação do 51A com 25 miRNAs. Para o RNA alvo do 51A, o mRNA SORL1, foram encontrados 72 miRNAs pela ferramenta TarBase v.8, 55 miRNAs pela ferramenta TargetScanHuman, 36 miRNAs pela ferramenta mirSystem e 224 miRNAs pela ferramenta miRDB.

Comparando os miRNAs obtidos por meio das ferramentas de predição de interação de miRNAs, foi possível encontrar apenas 2 miRNAs que podem interagir tanto com o 51A quanto com o SORL1, sendo que ambos miRNAs podem se parear em diferentes locais nas sequências. Na Tabela 6, é possível observar as identificações dos miRNAs citados, a sequência onde se pareiam na estrutura do lncRNA 51A e a sequência alvo desses miRNAs.

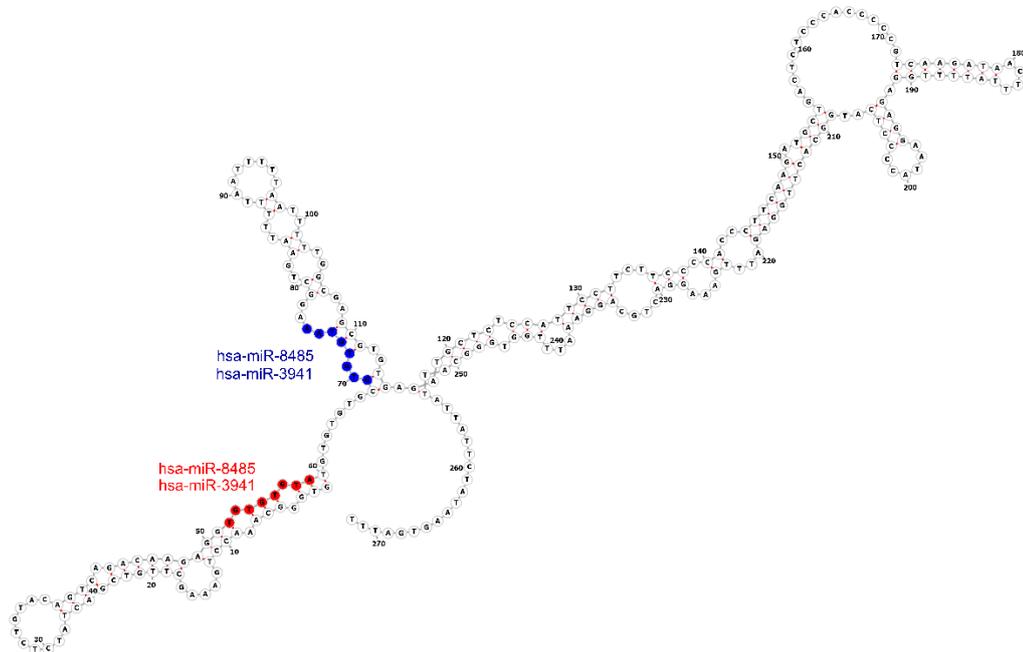
Tabela 6 - **MicroRNAs que interagem com 51A e SORL1.** A tabela mostra as identificações dos miRNAs que foram encontrados na busca de miRNAs que interagem com SORL1 e 51A. Os 2 miRNAs estão especificados na primeira coluna, baseado nas identificações mostradas nas ferramentas. Na segunda coluna estão as sequências de nucleotídeos onde os miRNAs interagem com 51A, sendo que um miRNA pode interagir em mais de uma sequência específica. Na última coluna está apresentada a sequência alvo que o miRNA interage com 51A por meio da complementaridade de bases.

miRNA	Nucleotídeos 51A	Sequência alvo
hsa-miR-8485	52-59	UGUGUGUA
hsa-miR-8485	69-75	GUGUGUA
hsa-miR-3941	53-59	GUGUGUA
hsa-miR-3941	69-76	GUGUGUAA

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

A Figura 27 mostra os locais onde os 2 miRNAs interagem na estrutura secundária do lncRNA 51A. Diretamente na estrutura secundária, pode-se observar que ambos miRNAs se pareiam em locais onde existem alguns elementos estruturais secundários, que podem ser sítios específicos de interação com moléculas. Na sequência de nucleotídeos 52-59, marcada em vermelho, onde interagem os miRNAs *hsa-mir-8435* e *hsa-mir-3941*, são encontrados 2 *loops* internos. Na sequência de nucleotídeos 69-76, marcada em azul, onde também interagem os miRNAs *hsa-mir-8435* e *hsa-mir-3941*, são encontrados 2 *loops* internos na sequência determinada. Possivelmente, o pareamento dos miRNAs nesses locais formam um triplex de fitas de RNA pareadas, acompanhada da interação com os elementos estruturais.

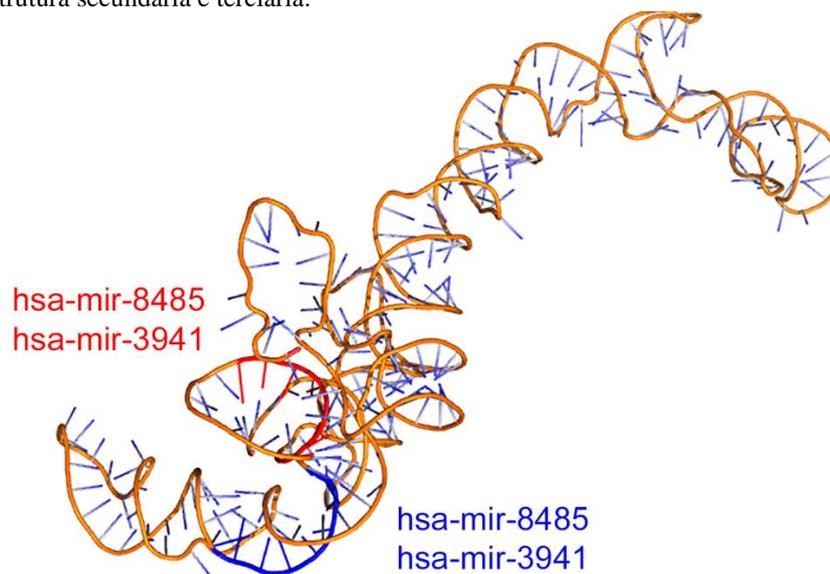
Figura 27 - **Locais de ligação de miRNAs na estrutura secundária de 51A.** A figura apresenta os locais de interação dos miRNAs na estrutura secundária de 51A, esses miRNAs interagem com SORL1 e 51A. As seqüências onde há interações e as identificações dos miRNAs que interagem nessas seqüências estão coloridas com a mesma cor.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Na Figura 28, pode-se observar a comparação dos locais de interação dos miRNAs na estrutura terciária. Foram mantidas as mesmas colorações encontradas na imagem da estrutura secundária referente aos locais de interação nas estruturas.

Figura 28 - **Locais de ligação de miRNAs na estrutura 3D de 51A.** A figura apresenta os locais de interação dos miRNAs que interagem com SORL1 e 51A, assim como a identificação dos miRNAs da interação. As cores representadas na estrutura secundária foram mantidas na estrutura terciária para comparação dos locais de interação da estrutura secundária e terciária.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

4.11. INTERAÇÕES DE MIRNAS COM 17A.

Os resultados obtidos para o lncRNA 17A, por meio da ferramenta miRDB, mostrou a de interação com 11 miRNAs. Para o RNA alvo do 17A, o mRNA GABAB2, foram encontrados 63 miRNAs pela ferramenta TargetScanHuman, 273 miRNAs pela ferramenta mirSystem e 241 miRNAs pela ferramenta miRDB.

Comparando os miRNAs obtidos por meio das ferramentas de predição de interação de miRNAs, foi possível constatar que apenas 1 miRNA pode interagir tanto com o 17A quanto com GABAB2, sendo que este miRNA pode interagir em dois locais diferentes na sequência. Na Tabela 7, estão as identificações do miRNA citado, os locais onde ele interage na estrutura do lncRNA 17A e as sequências alvos desses miRNA.

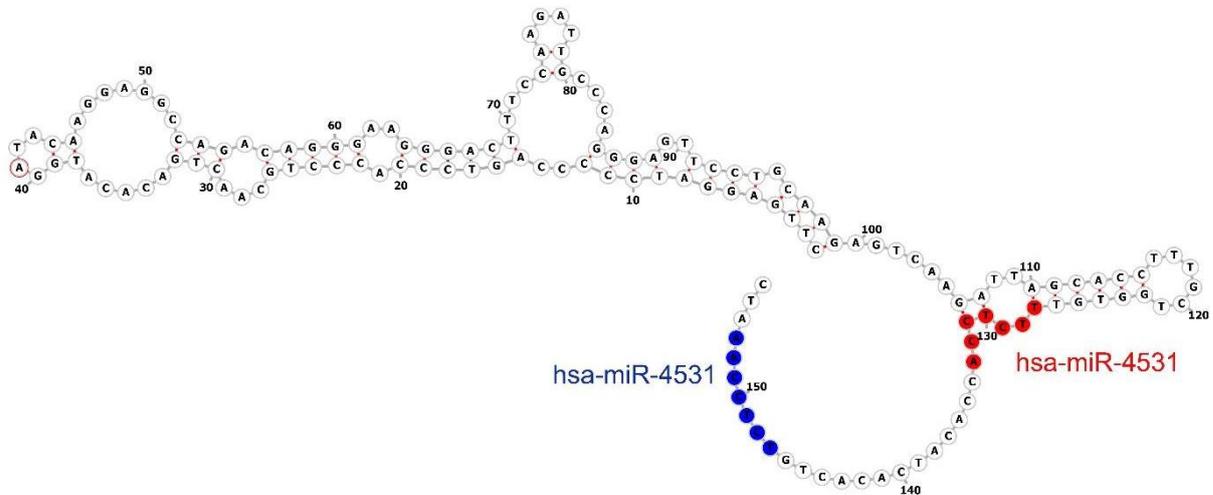
Tabela 7 - **MicroRNAs que interagem com 17A e GABAB2.** A tabela mostra a identificação do miRNA encontrado na busca de miRNAs que interagem com GABABe 17A. O miRNA está especificado na primeira coluna, baseado na identificação mostrada na ferramenta. Na segunda coluna está a sequência de nucleotídeos onde o miRNA interage com 17A, sendo que um miRNA pode interagir em mais de uma sequência específica. Na última coluna está apresentada a sequência alvo que o miRNA interage com 17A por meio da complementaridade de bases.

miRNA	Nucleotídeos 17A	Sequência alvo
hsa-miR-4531	127-133	UUCUCCA
hsa-miR-4531	147-153	UCUCCAA

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

A Figura 29 mostra os locais onde o miRNA interage na estrutura secundária do lncRNA 17A. Na sequência de nucleotídeos 127-133, marcada em vermelho, onde interage o miRNA *hsa-mir-4531*, pode ser encontrada a formação de uma fita única, nesse local o miRNA pode se parear com lncRNA e formar um duplex de fitas de RNA. Na sequência 147-153, marcada em azul, onde também interage o miRNA *hsa-mir-4531*, existe um local de fita única e um *loop* interno.

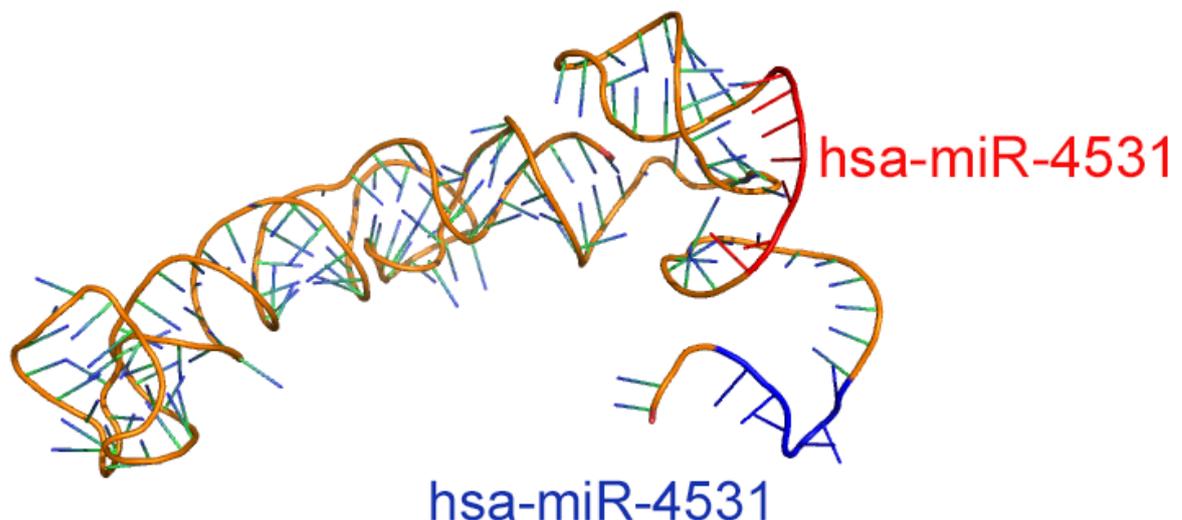
Figura 29 - **Locais de ligação de miRNAs na estrutura secundária de 17A.** A figura apresenta o local de interação do miRNA na estrutura secundária de 17A, esse miRNAs interagem com GABAB e 17A. As sequências onde há interações e a identificação do miRNA que interage nessas sequências estão coloridas com a mesma cor.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Na Figura 30, pode-se observar a comparação dos locais de pareamentos do miRNA na estrutura terciária. Foram mantidas as mesmas colorações encontradas na imagem da estrutura secundária referente aos locais de pareamento nas estruturas.

Figura 30 - **Locais de ligação de miRNAs na estrutura 3D de 17A.** A figura apresenta os locais de interação do miRNA que interage com GABAB e 17A, assim como a identificação do miRNA da interação. As cores representadas na estrutura secundária foram mantidas na estrutura terciária para comparação dos locais de interação da estrutura secundária e terciária.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

4.12. INTERAÇÕES DE MIRNAS COM NDM29.

Os resultados obtidos para o lncRNA NDM29, por meio da ferramenta miRDB, mostrou a possibilidade de interação com 16 miRNAs, mostrados na Tabela 10. Para o RNA alvo do

NDM29, o mRNA ASCL3, foram encontrados 18 miRNAs pela ferramenta TargetScanHuman, 4 miRNAs pela ferramenta mirSystem e 2 miRNAs pela ferramenta TarBase v.8.

Tabela 8 - **MicroRNAs que interagem com NDM29**. A tabela apresenta os miRNAs que interagem apenas com o lncRNA NDM29, esses miRNAs foram obtidos por meio da ferramenta miRDB. Na primeira coluna estão representadas as identificações dos 16 miRNAs que interagem com NDM29. Na segunda coluna estão representadas as sequências de nucleotídeos onde interagem os miRNAs. Na terceira coluna estão representadas as sequências alvo na estrutura do NDM29

miRNA	Nucleotídeos NDM29	Sequência alvo
hsa-miR-3149	184-191	CAUACAAA
hsa-miR-567	182-189	AACAUACA
hsa-miR-297	183-190	ACAUACAA
hsa-miR-504-3p	305-312	GCACUCCA
hsa-miR-3614-3p	22-28	GAAGGCU
hsa-miR-3941	80-87	GUGUGUAA
hsa-miR-4284	284-250	GUGAGCCA
hsa-miR-4524a-3p	169-175	CUGUCUC
hsa-miR-4524a-3p	335-342	CUGUCUA
hsa-miR-5193	37-43	AGGAGGA
hsa-miR-5193	249-255	AGGAGGA
hsa-miR-4691-3p	238-245	GUGGCUGA
hsa-miR-660-3p	37-43	AGGAGGA
hsa-miR-660-3p	248-255	CAGGAGGA
hsa-miR-6832-5p	172-179	UCUCUACA
hsa-miR-4524b-3p	168-175	CCUGUCU
hsa-miR-4524b-3p	334-340	CCUGUCU
hsa-miR-6778-3p	267-273	GGGAGGC
hsa-miR-6879-3p	317-324	GGGUGACA
hsa-miR-122-5p	306-312	CACUCCA

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Comparando os miRNAs obtidos por meio das ferramentas de predição de interação de miRNAs, não foi possível encontrar miRNAs que entram em contato com o lncRNA NDM29 e o mRNA ASCL3.

4.13. INTERAÇÕES DA ESTRUTURA 3D DE BACE1-AS COM MIRNAS.

Os resultados das predições de interações utilizando as sequências primárias dos RNAs possibilitaram a descoberta de miRNAs que podem interagir com os lncRNAs. No caso de BACE1-AS e BACE1, foram encontrados 17 miRNAs que podem interagir com suas sequências.

Para aprofundar a análise das interações dos lncRNAs com os miRNAs que podem participar do mecanismo ceRNA, foram realizadas análises de interações com as estruturas

terciárias dos miRNAs e de BACE1-AS, para verificar a possibilidade de interação entre suas estruturas e quais interações têm maior probabilidade de ocorrer.

Utilizando a ferramenta HNADOCK (He et al., 2019) foi possível realizar as interações entre as estruturas de ambos RNAs. Na Tabela 9, pode-se observar os miRNAs que interagiram com a estrutura terciária de BACE1-AS, a energia livre mínima das interações, o valor RMSD das interações e os locais onde podem ser encontrados os nucleotídeos de interação entre os dois RNAs. As interações com menor valor de energia livre mínima (MFE) possuem maior possibilidade de ocorrer em BACE1-AS e demonstra a estabilidade da interação. O RMSD é uma medida de distância entre o miRNA e o lncRNA, valores menores correspondem uma interação mais próxima entre as estruturas. Por final, os locais de interação mostram onde as bases dos miRNAs estão pareadas com os lncRNAs, esse resultado foi obtido por meio da ferramenta Pymol (Schrödinger e Delano, 2020).

Tabela 9 - Interações das estruturas 3D de BACE1-AS e miRNAs. A tabela apresenta a interação das estruturas 3D dos miRNAs com a estrutura 3D de BACE1-AS. Estão especificadas as identificações dos miRNAs na primeira coluna. Na segunda coluna está o valor de energia livre mínima (MFE) da interação do miRNA especificado com a estrutura de BACE1-AS, quanto menor o valor, maior a estabilidade da interação. Na terceira coluna está especificado o RMSD, medida de distância média entre o lncRNA e o miRNA, que, quanto menor o valor, melhor a interação. Na quarta coluna estão especificadas as bases que interagem entre o lncRNA e miRNA, sendo a base a esquerda do traço correspondente a BACE1-AS, e a direita do traço, correspondendo ao miRNA.

(continua)

miRNA	MFE (kcal/mol)	RMSD ligante (Å)	Locais de interação
hsa-let-7b-5p	-169.68	164.66	C631-G12; A658-U9; U673-G8
hsa-let-7c-5p	-205.25	156.51	A662-U9
hsa-let-7e-5p	-199.94	185.87	C631-G5; A632-U18; U665-A19; C664-G20; A662-U21
hsa-let-7g-5p	-233.59	156.87	G646-U16; C620-G15; A669- U12
hsa-let-7i-5p	-183.64	221.04	A666-U22; A669-U16
hsa-miR-1226-3p	-231.49	251.09	G558-C5; U556-G7; G183-C18; C188-G22
hsa-miR-130a-3p	-226.48	237.57	C440-G17; U465-A16; U435-A2; G434-C1
hsa-miR-130b-3p	-221.23	234.01	C459-G17; U458-G18
hsa-miR-196b-5p	-258.70	246.32	A357-U19; C359-G17; U363-G7; A420-U16; G417-U10
hsa-miR-301b-3p	-166.38	527.09	C469-G1; G466-C19; C438-G18

(continuação)

miRNA	MFE (kcal/mol)	RMSD ligante (Å)	Locais de interação
hsa-miR-382-5p	-276.71	286.06	U351-A2; U441-G4; G357-C21
hsa-miR-454-3p	-171.52	384.62	G484-U1; C339-G3; A474-U23
hsa-miR-625-5p	-279.74	349.07	U338-A9; G484-C21; G486-C20; U336-G5;
hsa-miR-98-5p	-179.97	159.52	U626-G2; C631-G8; A632-U13; U665-G15; C664-U12
hsa-miR-500a-5p (47-71)	-171.14	348.04	A803-U1; C73-G16; A72-U15; G36-C14
hsa-miR-500a-5p (680-687)	-193.34	304.14	A644-U19; G683-U15
hsa-miR-1303 (9-28)	-216.64	399.36	G26-U21
hsa-miR-1303 (633-640)	-151.65	415.05	C620-G11
hsa-miR-642a-5p (117-126)	-200.03	132.52	G119-U6; U121-A11; C786-G22
hsa-miR-642a-5p (472-479)	-217.85	163.66	U340-A11; C337-G22

Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

(conclusão)

Alguns miRNAs interagiram parcialmente nos locais especificados na Tabela 5, que se refere aos locais onde os miRNAs interagem na sequência de BACE1-AS. Porém, como a estrutura 3D não interage seguindo apenas os pareamentos de bases WC das sequências especificadas, a estrutura pode utilizar outros nucleotídeos além do especificado para manter a estabilidade da molécula. Por exemplo o miRNA hsa-miR-98-5p, que na Tabela 5 está especificado para interagir com a sequência entre os nucleotídeos “660-667”, mas na estrutura 3D interage com dois nucleotídeos dentro da sequência e outros três fora da sequência especificada. Esse caso acontece em quase todos os miRNAs citados que interagem com BACE1-AS e ocorre para que a interação seja a mais estável possível.

Todos os miRNAs interagiram com BACE1-AS, porém, ao analisar os locais de interações, alguns possuem apenas um par de base interagindo, como por exemplo: hsa-mir-1303 e hsa-let-7c-5p. Dificilmente haveria apenas um pareamento entre lncRNA e miRNA, mesmo em caso de ceRNAs, e, devido a isso, há poucas possibilidades de ambos miRNAs interagirem de forma estável com BACE1-AS.

Outros miRNAs com duas ou mais bases interagindo, podem interagir com lncRNA, dependendo de seu valor de energia livre mínima. Todos os miRNAs possuem interações com

valor MFE consideravelmente baixo, o que pode levar a interações estáveis, excluindo os miRNA hsa-mir-1303 e hsa-let-7c-5p, que possuem apenas uma base interagindo, sendo biologicamente incomum.

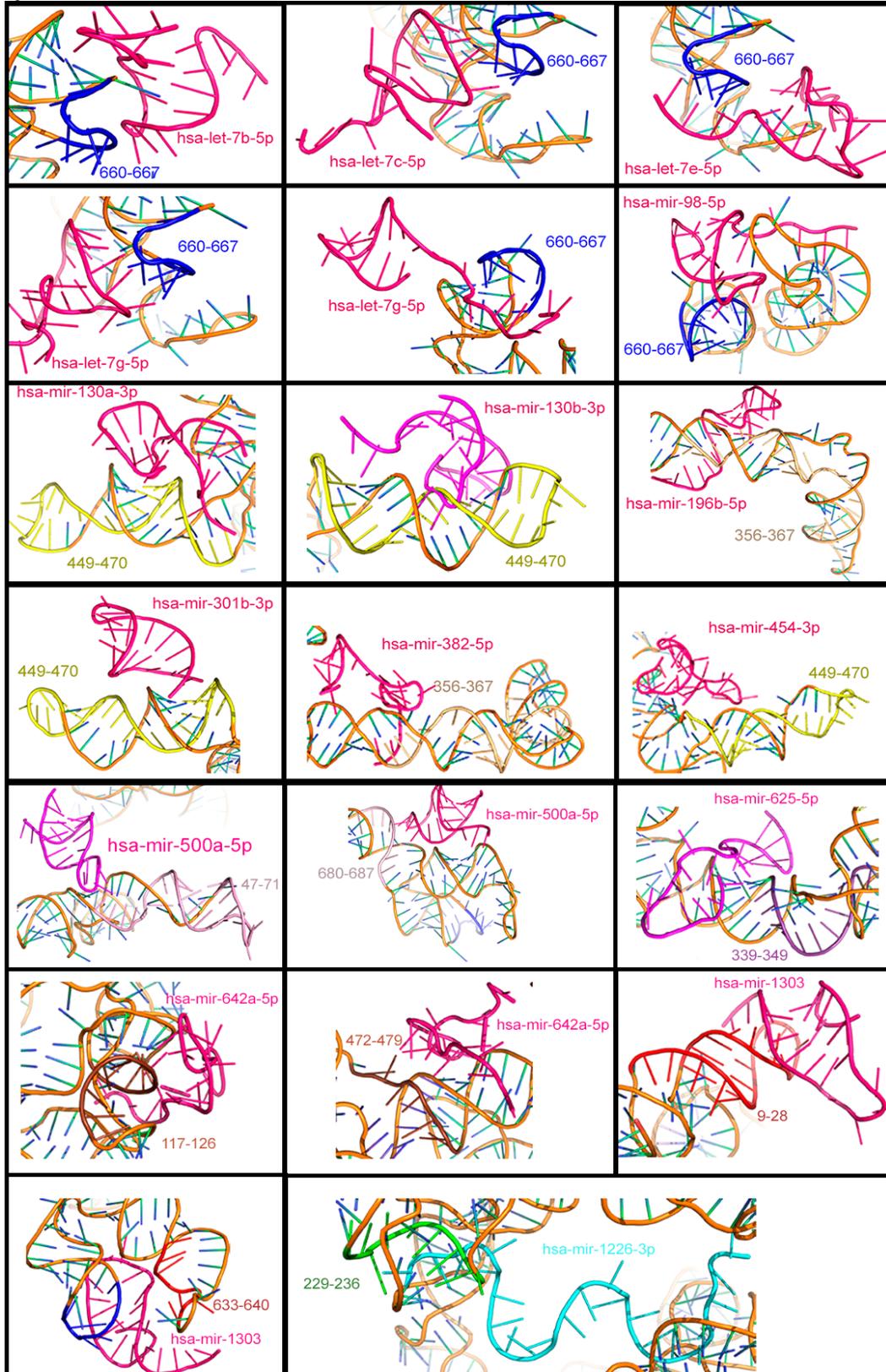
Cada miRNA está em posições diferentes baseado na conformação de sua estrutura 3D e também nos nucleotídeos que estão interagindo com a estrutura 3D de BACE1-AS. Alguns miRNAs não interagem totalmente com as sequências especificadas, como mencionado anteriormente, e interagem com outros nucleotídeos além do especificado. Esse fator também altera as posições das estruturas 3D dos miRNAs. Por esse motivo, é possível notar que alguns miRNAs estão em uma distância considerável da sequência colorida. Por exemplo, o miRNA hsa-mir-382-5p, que está distante da sequência especificada devido a interação com outros nucleotídeos além do especificado.

Outro exemplo de distância entre lncRNA e miRNA é o miRNA hsa-mir-301b-3p, que baseado em seu valor RMSD, é o miRNA que está mais distante da estrutura de BACE1-AS. O miRNA está a uma distância considerável da estrutura, onde apenas suas sequências 5' e 3' estão mais próximas na interação com a sequência 449-470.

O miRNA hsa-mir-1303 também é outro exemplo de miRNA distante, pois seu valor RMSD é o segundo maior das predições. Sua interação com a sequência “633-640” é notavelmente distante, e sua interação com apenas dois nucleotídeos, torna uma interação menos estável.

Na Figura 31 estão as estruturas 3D dos miRNAs, modeladas pela ferramenta HNADOCK (He et al., 2019), durante a predição de interações de BACE1-AS com os miRNAs. É possível observar na figura as estruturas 3D dos miRNAs representadas na coloração magenta, enquanto as sequências de interação especificada na Tabela 5, estão na mesma coloração que as figuras da estrutura secundária (Figura 25) e da estrutura terciária (Figura 26) de BACE1-AS.

Figura 31 - **Estruturas 3D dos miRNA interagindo com BACE1-AS.** A figura mostra as estruturas 3D de cada miRNA que pode interagir com BACE1-AS e BACE1, especificadas no projeto. Alguns miRNAs interagem no mesmo local, porém sua disposição é diferente devido a sua sequência e interação com BACE1-AS. As estruturas 3D em magenta representam os miRNAs e os locais de interação foram coloridos conforme a Figura 26 (Locais de interação na estrutura 3D de BACE1-AS).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

4.14. INTERAÇÕES DA ESTRUTURA 3D DE 51A COM MIRNAS.

Diferentemente de BACE1-AS, apenas 2 miRNAs foram relacionados como moléculas que interagem com o lncRNA 51A e com o mRNA SORL1. Esses miRNAs são identificados como hsa-mir-3941 e hsa-mir-8485. E assim como no caso de BACE1-AS, também foram realizadas análises dessas interações na estrutura terciária de 51A.

Utilizando a ferramenta HNADOCK (He et al., 2019), foram realizadas as interações a partir da estrutura terciária de 51A. Na Tabela 10, é possível observar as identificações dos miRNAs que interagem com 51A e SORL1, a energia livre mínima das interações, o valor RMSD das interações e os locais onde podem ser encontrados os nucleotídeos de interação entre os dois RNAs. Os locais de interação foram verificados por meio da ferramenta Pymol (Schrödinger e Delano, 2020).

Tabela 10 - **Interações das estruturas 3D de 51A e miRNAs.** A tabela apresenta a interação das estruturas 3D dos miRNAs com a estrutura 3D de 51A. Estão especificadas as identificações dos miRNAs na primeira coluna. Na segunda coluna está o valor de energia livre mínima (MFE) da interação do miRNA especificado com a estrutura de 51A, quanto menor o valor, maior a estabilidade da interação. Na terceira coluna está especificado o RMSD, medida de distância média entre o lncRNA e o miRNA, que, quanto menor o valor, melhor a interação. Na quarta coluna estão especificadas as bases que interagem entre o lncRNA e miRNA, sendo a base a esquerda do traço correspondente a 51A, e a direita do traço, correspondendo ao miRNA.

miRNA	MFE (kcal/mol)	RMSD ligante (Å)	Locais de interação
hsa-mir-3941 / 52-59	-210.76	126.66	G13-A5; G17-A5; A49-C6; G48-C6; G17-C6; C18-A7; G48-A7
hsa-mir-3941 / 69-75	-198.25	124.95	C18-U1; G17-U1; A49-A14; G48-A14; G48-G15; G17-G15; A14-G15; A14-G16; A15-G16; A14-A17; G51-A20; C80-A22
hsa-mir-8485 / 53-59	-276.89	37.84	C260-C5; A257-C7; A261-A8; G266-A8; C260-C9; U259-C11
hsa-mir-8485 / 69-96	-283.80	374.45	A91-A2; A91-C3; A91-A4; U92-A4; U92-A4; U93-A10; A90-A10; G4-C17; C80-A20; C106-U21

Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

Analisando as interações, podemos verificar que, os nucleotídeos de interação não compõem a sequência especificada conforme a Tabela 6, onde estão especificadas as sequências de interação. Como resultado, é possível que não haja interações nas sequências previstas pelas ferramentas de predição de interação de miRNAs com sequências primárias.

Grande parte das interações com a estrutura 3D de 51A são formadas por interações não canônicas, isto é, não seguem os padrões de pareamento Watson-Crick. Isso ocorre devido a

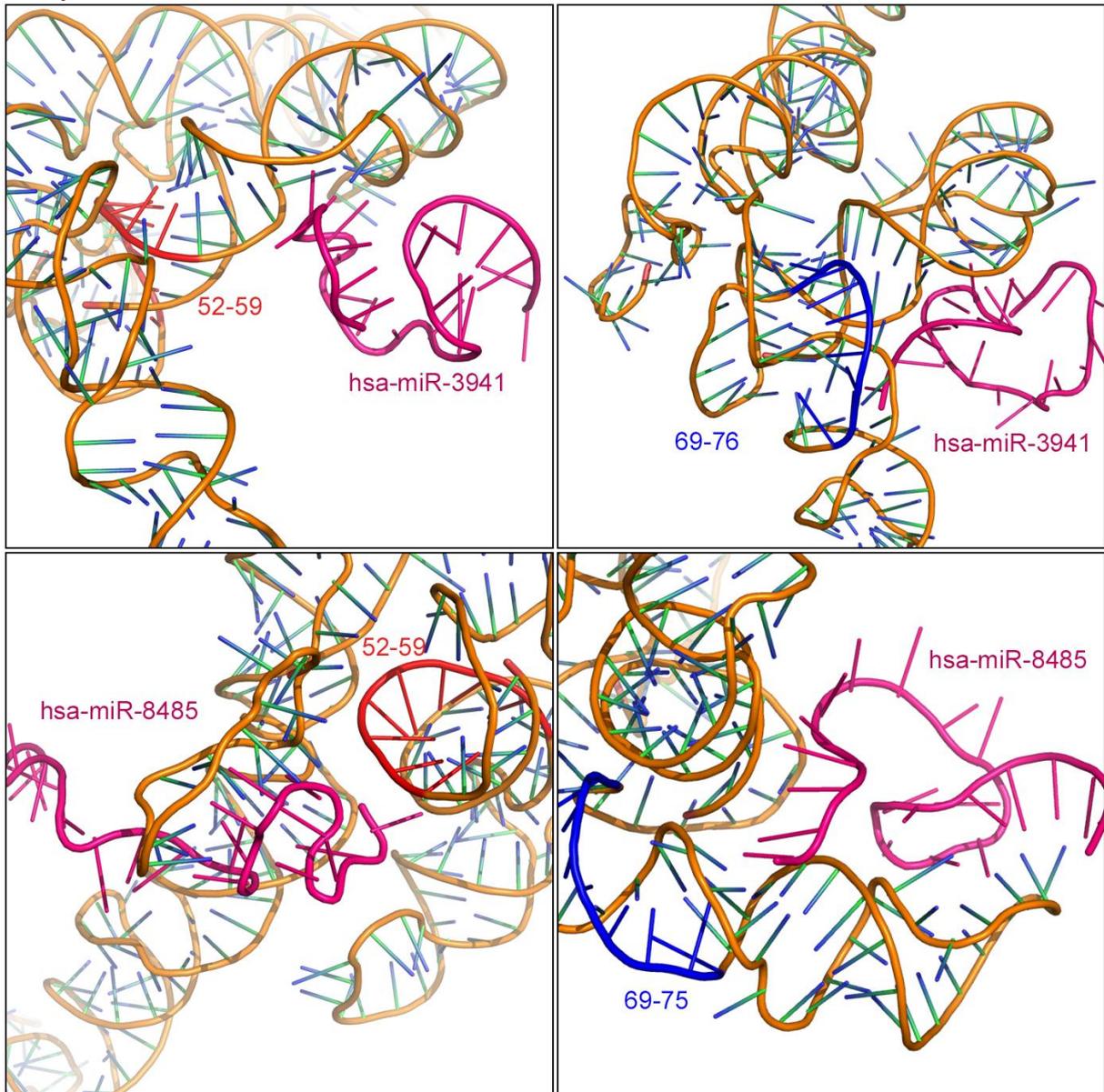
necessidade de manter a estabilidade entre a estrutura 3D do miRNA e do lncRNA. Como comentado anteriormente, a estrutura 3D pode interagir de diversas maneiras com outras moléculas, muitas vezes não seguindo os padrões WC.

Um exemplo de pareamentos não canônicos nos miRNAs é o miRNA hsa-mir-3941, entre a sequência 52-59, onde apenas ocorre um pareamento WC nas bases G17-C6, enquanto os outros locais interagem para manter a estabilidade dessa interação. O mesmo ocorre quando o mesmo miRNA interage com a sequência 69-75, onde há apenas pareamento WC nos nucleotídeos G17-U1, enquanto as outras interações agem para manter a estabilidade.

Na Figura 32 estão as estruturas 3D dos miRNAs, modeladas pela ferramenta HNADOCK (He et al., 2019), geradas pela predição de interações de 51A com os miRNAs. As estruturas 3D dos miRNAs estão representadas na coloração magenta, enquanto as sequências de interação especificadas na Tabela 7, estão na mesma coloração que as figuras da estrutura secundária (Figura 27) e da estrutura terciária (Figura 28) de 51A.

Analisando as interações presentes nas figuras, pode-se notar que os miRNAs (em magenta) estão há uma distância considerável das sequências especificadas (azul e vermelho), que foram previstas pelas ferramentas. Isso demonstra que esses locais não são locais para interações estáveis entre os miRNAs previstos e o lncRNA 51A. Outros locais, como os mostrados na Figura 32, são locais onde esses miRNAs podem interagir com maior estabilidade. Esses foram locais encontrados pela ferramenta HNADOCK (He et al., 2019), onde as interações possuem o menor valor de energia livre mínima, que demonstra estabilidade e maior probabilidade de essa interação ocorrer.

Figura 32 - **Estruturas 3D dos miRNA interagindo com 51A**. A figura mostra as estruturas 3D de cada miRNA que pode interagir com 51A e SORL1, especificadas no projeto. Alguns miRNAs interagem no mesmo local, porém sua disposição é diferente devido a sua sequência e interação com BACE1-AS. As estruturas 3D em magenta representam os miRNAs e os locais de interação foram coloridos conforme a Figura 28 (Locais de interação na estrutura 3D de 51A).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

4.15. INTERAÇÕES DA ESTRUTURA 3D DE 17A COM MIRNAS.

O 17A é o último lncRNA do projeto que pode ter mecanismo ceRNA, visto que, o lncRNA NDM29 não possui mecanismo ceRNA baseado nas interações com a sequência prevista nos resultados anteriores.

Nos resultados baseados na sequência de 17A, encontramos apenas 1 miRNA que interage com esse lncRNA e seu mRNA alvo. O miRNA em questão é o hsa-mir-4531. Esse

miRNA interage em dois locais diferentes na sequência primária. Ambos locais foram utilizados para análise da interação na estrutura 3D modelada para 17A.

As sequências previstas para interação de 17A com *hsa-mir-4531* estão presentes entre os nucleotídeos “127-133” e “147-153”. Na Tabela 11, é possível observar as características das interações na estrutura 3D de 17A, realizadas pela ferramenta HNADOCK (He et al., 2019). Assim como, a energia livre mínima das interações, o valor RMSD e os nucleotídeos de interação de ambos os locais da interação do miRNA.

Tabela 11 - **Interações das estruturas 3D de 17A e miRNAs.** A tabela apresenta a interação das estruturas 3D dos miRNAs com a estrutura 3D de 17A. Estão especificadas as identificações dos miRNAs na primeira coluna. Na segunda coluna está o valor de energia livre mínima (MFE) da interação do miRNA especificado com a estrutura de 17A, quanto menor o valor, maior a estabilidade da interação. Na terceira coluna está especificado o RMSD, medida de distância média entre o lncRNA e o miRNA, que, quanto menor o valor, melhor a interação. Na quarta coluna estão especificadas as bases que interagem entre o lncRNA e miRNA, sendo a base a esquerda do traço correspondente a 17A, e a direita do traço, correspondendo ao miRNA

miRNA	MFE (kcal/mol)	RMSD ligante (Å)	Locais de interação
hsa-mir-4531 127-133	-183.52	235.76	U124-A1; U102-G3; U2-U15; C1-U15; C1-G16; A100-A16; G101-A17; A100-U15
hsa-mir-4531 147-153	-235.77	200.64	A141-G3; G146-A5; G146-G6; U147-G6; C150-G10; C150-C11; C151-C11; G146-U12; U145-U13; C144-C14; C142-C14; A143-U15; A141-A17; U139-A17

Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

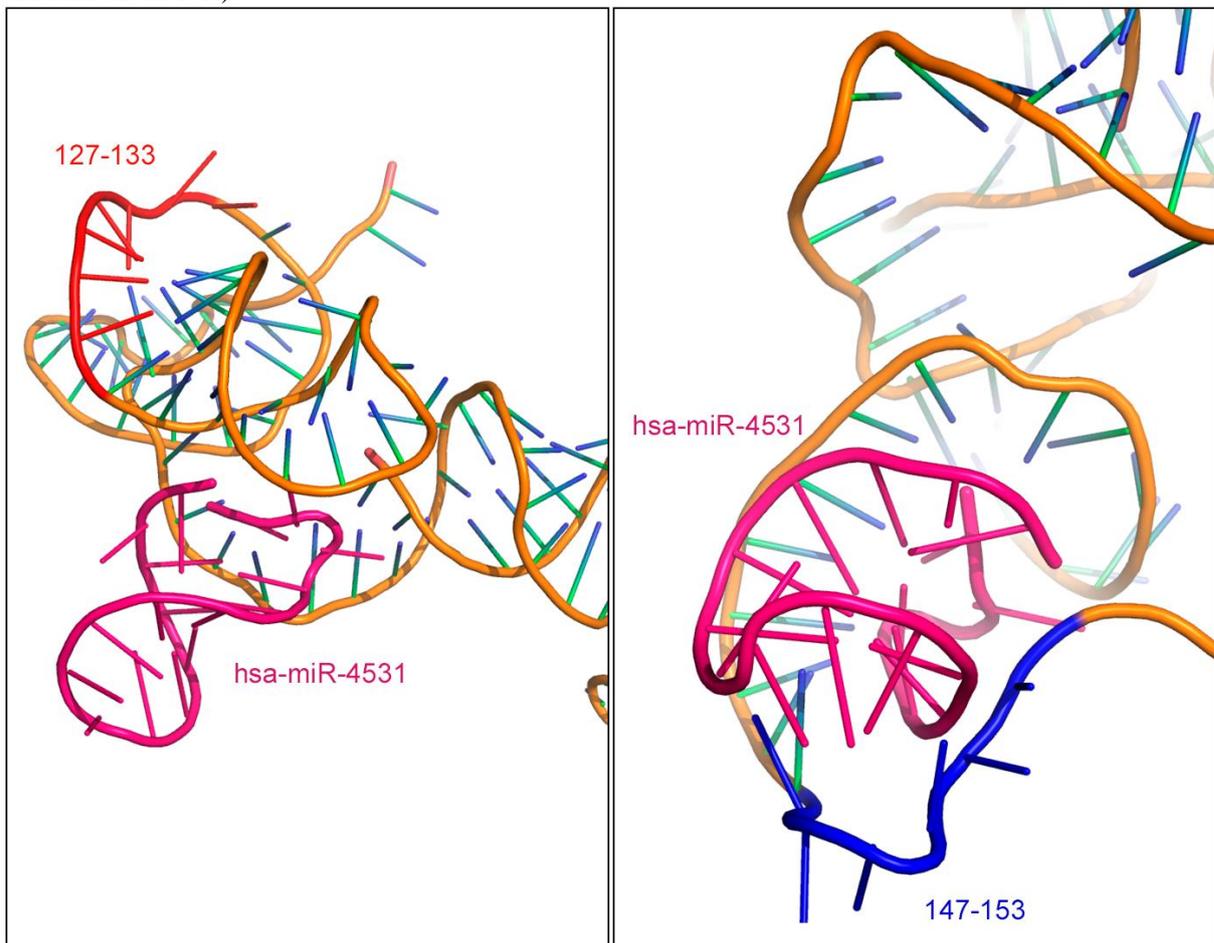
Assim como no caso do lncRNA 51A, diversas interações presentes na estrutura 3D de 17A não seguem os padrões canônicos Watson-Crick. Na interação de *hsa-mir-4531* prevista para a primeira sequência (127-133), apenas “U124-A1”, “U102-G3”, “C1-G16” e “A100-U15” seguem os pareamentos WC. Enquanto as restantes não seguem os pareamentos WC. As interações adicionais ocorrem para manter a estabilidade dos pareamentos ocasionados.

Na segunda sequência prevista (147-153) existem maior quantidade de interações que na primeira sequência prevista. Além da quantidade maior de interações, a energia livre mínima e o valor RMSD são menores que os valores da primeira sequência. A diferença de valor de energia livre mínima da segunda interação para a primeira interação é cerca de -52 kcal/mol.

Os nucleotídeos de interação da segunda sequência estão maior quantidade, resultando em 14 interações, e a interação ocorre em grande parte dentro da sequência prevista. Apenas 5 das 14 interações seguem pareamentos canônicos. Isso demonstra que as interações não canônicas viabilizam a interação desse miRNA com 17A de forma estável. Dessa forma, esse local é melhor local para interação do miRNA *hsa-mir-4531*.

Na Figura 33, pode-se observar as interações do miRNA em locais distintos na estrutura 3D de 17A. No local da interação com a sequência “127-133”, o miRNA está a uma distância considerável da sequência prevista, demonstrando que há necessidade de interagir com outros nucleotídeos para manter a estabilidade da interação. Já na sequência “147-153”, a interação ocorre diretamente na sequência prevista, demonstrando que há grande probabilidade de ocorrer pareamentos estáveis nessa sequência. Vale ressaltar que a segunda sequência prevista está ao final da sequência do miRNA, onde não há nenhum elemento estrutural formado, apenas uma fita única sem pareamento.

Figura 33 - **Estruturas 3D dos miRNA interagindo com 17A**. A figura mostra as estruturas 3D de cada miRNA que pode interagir com 17A e GABAB, especificadas no projeto. Alguns miRNAs interagem no mesmo local, porém sua disposição é diferente devido a sua sequência interação com BACE1-AS. As estruturas 3D em magenta representam os miRNAs e os locais de interação foram coloridos conforme a Figura 30 (Locais de interação na estrutura 3D de 17A).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

5. DISCUSSÃO

Atualmente, a doença de Alzheimer (DA) segue sendo uma doença prevalente em pessoas com mais de 60 anos, e devido a isso, há uma enorme busca de terapias que auxiliem no retardamento e/ou na cura da doença. Em junho de 2021, houve a aprovação de um novo

medicamento, o Aducanumab. Esse é o primeiro medicamento aprovado para DA em quase duas décadas, o que acabou levando a grandes discussões e ao levantamento de controvérsias por pesquisadores da área, havendo um grande debate sobre sua eficácia.

O medicamento Aducanumab é o primeiro que atua em uma das principais vias patogênicas da DA, a via amiloidogênica, ou cascata amiloide, tendo como alvo a proteína BACE1 (beta-amiloide). Essa patogênese é um dos alvos deste projeto, sendo que todos os lncRNAs estudados contribuem, diretamente ou indiretamente, para a produção do componente final dessa patogênese, o peptídeo neurotóxico A β .

Os lncRNAs citados mostraram papéis cruciais na progressão da DA, o que pode levar a descobertas de novas patogêneses resultantes da presença desse lncRNAs nos cérebros de pacientes com DA, e não apenas contribuindo para outras patogêneses conhecidas. Para se compreender o papel exato dessas moléculas, é necessário o conhecimento de todas as suas estruturas e possíveis interações com outras moléculas. Os lncRNAs interagem com mRNAs que possuem as mesmas sequências, e proteínas codificadas por esses mRNAs. Mas, um conhecimento completo das estruturas dos lncRNAs podem levantar novas questões e a descoberta de novas interações com outras moléculas, que podem ou não, contribuir na compressão total do funcionamento desses lncRNAs e seu impacto real na DA.

Na última década, foi demonstrado que o perfil desregulado de lncRNAs está amplamente envolvido na patogênese de muitas doenças, incluindo câncer, distúrbios metabólicos e doenças cardiovasculares. Os lncRNAs desempenham um papel importante no crescimento de tumores, metástase e muitos lncRNAs têm se mostrado potenciais biomarcadores, alvos para o diagnóstico e tratamento de cânceres (Chi et al., 2019).

O objetivo inicial do projeto foi modelar as estruturas secundárias e terciárias dos lncRNAs relacionados com a DA. A obtenção dessas estruturas auxilia no entendimento e na compreensão do mecanismo de funcionamento dessas moléculas, qual seu papel crucial na DA, suas interações com outras moléculas e possíveis inibidores.

A predição das estruturas secundárias foi o primeiro passo, o conhecimento da estrutura secundária é essencial para compreender a relação entre estrutura e função. Identificar as estruturas pode contribuir para a compreensão das atividades do RNA no processo biológico envolvido. A predição da estrutura secundária de RNA desempenha um papel significativo na busca por estruturas de RNA biologicamente importantes na riqueza de dados de sequência genômica produzidos atualmente (Gorodkin et al., 2010).

Utilizando métodos computacionais específicos para predição da estrutura secundária por meio da ferramenta Mfold, foi possível obter as estruturas secundárias dos lncRNAs. Devido à utilização de uma ferramenta computacional para a obtenção dessas estruturas, o método de escolha a partir da energia livre mínima foi empregado em cada estrutura.

A quantidade de métodos computacionais para modelagem de RNAs e suas interações é grande, o que facilita os estudos dessas moléculas sem um grande custo e gasto de tempo. Os métodos de predição de estruturas de RNA continuam se aprimorando e cada vez mais tornando as estruturas geradas mais precisas apenas com a sequência primária de RNA. Por esses motivos, os lncRNAs com relação a DA foram modelados por meio de ferramentas computacionais, devido a sua facilidade de manuseio, respostas rápidas e uma gama de resultados para serem analisados

Os RNAs são compostos, em grande parte, por motivos. Pode-se encontrar diversas categorias de motivos em estruturas secundárias de RNA. Os mais conhecidos são os motivos grampo (*hairpin*), composto por uma haste e uma alça terminal, e também os *loops* internos, compostos por duas fitas sem pareamento, formando uma alça. Esses motivos estruturais compreendem a estrutura secundária do RNA sendo unidos por interações terciárias em uma estrutura tridimensional.

O lncRNA BACE1-AS foi o primeiro RNA previsto por meios computacionais no projeto, resultando em 27 estruturas diferentes para uma única sequência primária. Analisando as estruturas disponíveis, pode-se notar que a sequência primária desse lncRNA pode formar diferentes conformações estruturais, porém, apenas uma foi selecionada para representar esse lncRNA e para ser utilizada como estrutura secundária de BACE1-AS. O lncRNA pode não ter apenas uma conformação, mas as diferenças dependem do ambiente em que essa molécula se encontra. A estrutura secundária de BACE1-AS segue as regras da termodinâmica e foi prevista em uma simulação de ambiente a 37°C, sendo essa temperatura, a temperatura normal do corpo humano.

Na estrutura secundária de BACE1-AS podem ser encontradas diversos elementos secundários, a estrutura tem em sua conformação 61 hélices, 31 *loops* internos, 12 *bulge loops*, 12 grampos (*hairpins*), 8 *multi-loops* e 1 *loop* externo. Dentre todos os elementos secundários, os grampos podem ser as estruturas mais atrativas para pareamentos de outras moléculas com o BACE1-AS. Como existe o total de 12 grampos, a quantidade e diversidade de pareamentos pode ser grande, podendo interagir com diferentes moléculas ou com mais de uma molécula

simultaneamente. A quantidade de alças internas também é grande na estrutura secundária de BACE1-AS, um total de 31 *loops* internos e 12 *bulge loops*, onde podem haver pareamentos de diferentes classes de RNAs, formando estruturas de fita dupla entre uma fita lncRNA e uma fita de RNA ligante, ou uma estrutura triplex com três fitas de nucleotídeos dos RNAs.

Uma representação da estrutura secundária do lncRNA BACE1-AS pode ser encontrada no trabalho publicado em 2019 por Ashraf e colaboradores. Neste estudo, a pesquisa é voltada à importância dos resíduos formadores de β -turns mais conhecidos entre a proteína BACE1 e outras citadas, como um fator potencialmente crucial na regulação do dobramento, agregação e outras interações intermoleculares. O estudo não é específico para a predição da estrutura de BACE1-AS. Dessa forma, até o momento não há publicação de estudos ou depósito em banco de dados das estruturas secundária e terciária de BACE1-AS.

O lncRNA 51A foi a segunda molécula prevista por métodos computacionais, sendo a segunda menor sequência do projeto, resultou em apenas nove estruturas secundárias diferentes. A estrutura secundária do 51A não foi encontrada em nenhum estudo publicado e em nenhum banco de dados de RNAs, diferente de BACE1-AS que pode ser encontrada em apenas um estudo.

Na estrutura secundária selecionada para o 51A, como menor energia livre mínima, entre as nove disponíveis como resultado da ferramenta Mfold, podem ser encontrados quatro grampos. Os grampos disponíveis podem ser motivos de ligações para outras moléculas, como o pré-mRNA do gene SORL1, alvo de 51A, ou miRNAs que possam silenciar esse lncRNA.

Além disso, ainda existem 10 *loops* interno e 4 *bulges loops* presentes entre nas hélices formadas na estrutura de 51A, onde podem ocorrer interações com outras moléculas. Vale a pena ressaltar que a estrutura também possui um local de fita única, formada pelos nucleotídeos “254 – 272”, compondo o final da estrutura da molécula. Esse local pode possuir o papel de motivo para outras moléculas, como o pré-mRNA de SORL1.

O lncRNA 17A foi a terceira molécula prevista por métodos computacionais, essa é a molécula que possui a menor sequência do projeto. Se discute se 17A pode ser considerado um lncRNA devido a sua sequência, que possui menos de 200 nucleotídeos, sendo menor que o mínimo previsto para um lncRNA. Porém, como é um ncRNA que participa na regulação de outras moléculas de RNA, sendo transcrito pela RNA polimerase III, é considerado um lncRNA, assim como outros produzidos pela mesma polimerase.

O 17A é um dos lncRNAs menos compreendidos dentre a maioria que possui relação com DA. Até o momento, existem poucas publicações que pesquisem o real mecanismo desse lncRNA e ainda menos pesquisas relacionadas com organismos vivos. Não há nenhuma publicação de estudo ou depósito em banco de dados que possua alguma representação da estrutura do lncRNA 17A. Muito disso é devido ao fato que esse lncRNA é considerado recente e não possui a mesma atenção que BACE1-AS e 51A, sendo esses lncRNAs bem mais compreendidos e ilustrados na bibliografia.

A estrutura com menor energia livre mínima, considerada a ideal para representação lncRNA 17A, foi selecionada a partir de 11 estruturas resultantes da ferramenta Mfold. Nessa estrutura são encontrados três grampos, os grampos podem ser motivos de ligações com outras moléculas, por exemplo, o pré-mRNA do gene GABAB2, alvo do 17A. Dois desses grampos possuem a mesma quantidade de nucleotídeos, os mesmos nucleotídeos, mas com disposições diferentes. Podem ser encontrados na sequência “38-45” e “73-80”, com suas respectivas sequências “UGGAUACA” E “CAAGAUGU”. Os grampos citados podem ser motivos específicos de moléculas por possuir sequências semelhantes.

O lncRNA NDM29 possui a segunda maior sequência do projeto, devido a seu comprimento, a ferramenta computacional resultou dezenove estruturas diferentes para análise. Novamente, a estrutura com menor energia livre mínima foi selecionada. O NDM29, assim como o 17A, é considerado novo e existem poucas publicações relacionadas com a DA. Porém, o NDM29 também possui uma função em neuroblastomas, demonstrando que esse lncRNA possui mais de um papel além de impulsionar a produção de peptídeos A β .

O NDM29 restringe o desenvolvimento de neuroblastomas, promovendo a diferenciação celular e a redução de células iniciadoras de tumor na população de células de neuroblastomas. Notavelmente, a superexpressão de NDM29 também confere às células malignas de neuroblastoma, uma suscetibilidade imprevista aos efeitos dos medicamentos antitumorais usados na terapia (Castelnuovo et al., 2010).

Até o momento, não há nenhuma publicação que possua uma representação da estrutura secundária do lncRNA NDM29. Analisando a estrutura selecionada para representação nesse projeto, essa estrutura apresenta 4 grampos em sua conformação, que podem ser possíveis motivos de pareamentos de diversas moléculas. Como citado anteriormente, o NDM29 possui mais de um papel no organismo, por esse motivo, é provável que mais de um tipo de molécula interaja com a estrutura desse lncRNA.

Outro elemento notável na estrutura secundária de NDM29, é um *loop* interno grande que possui 18 nucleotídeos em um lado da fita sem pareamento. Esse elemento estrutural é encontrado entre os nucleotídeos “175 – 193” e pode ser um motivo de pareamento na estrutura. Além do *loop* interno, existe uma fita única ao final da sequência da estrutura, assim como o 17A e o 51A, porém, como um comprimento menor. Essa fita simples pode ser considerada também um motivo de pareamento com outras moléculas.

A obtenção das estruturas secundárias dos lncRNAs mostram as possibilidades de dobras que uma sequência primária pode tomar, essas dobras formam motivos que podem ter o papel de interagir com outras moléculas, fazendo com o que os lncRNAs exerçam sua função reguladora. Porém, apenas com a estrutura secundária não é possível analisar as possíveis interações que um lncRNA pode realizar, é necessário o conhecimento e obtenção da estrutura terciária para possibilitar a análise dos pareamentos que o lncRNA pode realizar.

A estrutura terciária é o conjunto completo de coordenadas tridimensionais de todos os átomos da estrutura do RNA. A estrutura terciária é crucial para observar a formação de uma infinidade de motivos terciários, como *pseudoknots*, empilhamento de hélices, emparelhamento de múltiplas bases e interações *loop-loop*, que determina a forma molecular no espaço físico. Dessa forma, as estruturas 3D de RNAs são essenciais para a compreensão de suas diversas e importantes funções biológicas.

Devido à importância da estrutura 3D para o conhecimento das funções moleculares, o objetivo deste projeto foi também modelar as estruturas 3D dos lncRNAs relacionados à DA. Essas estruturas demonstram como cada lncRNA possui uma estrutura 3D específica para interações com outras moléculas, por exemplo miRNAs.

A primeira estrutura terciária modelada foi a estrutura do lncRNA BACE1-AS, assim como foi com a estrutura secundária. Até o momento, não houve nenhuma publicação relacionada à estrutura terciária de BACE1-AS. A estrutura 3D foi modelada baseada na estrutura secundária prevista para essa molécula, dessa forma, todos os elementos secundários e motivos estão presentes na estrutura 3D.

A estrutura terciária de BACE1-AS é a mais complexa de todas modeladas neste projeto, devido a sua quantidade de elementos e comprimento da sequência primária. A estrutura 3D de BACE1-AS pode contribuir na descoberta de novas interações que acontecem no lncRNA. A análise das interações pode elucidar os mecanismos da estrutura relacionados ao BACE1-AS e

a DA. Além disso, a estrutura pode contribuir na descoberta de novos papéis que BACE1-AS pode possuir além de sua relação com a DA.

O lncRNA BACE1-AS possui outro papel além de atuar na DA. O BACE1-AS é significativamente superexpresso no câncer de fígado, sugerindo seu papel tumorigênico (Nie et al., 2020). Esse caso demonstra que a estrutura dessa molécula pode possuir diferentes mecanismos e interações, e também pode demonstrar que BACE1-AS possui diferentes estruturas terciárias baseadas no meio que se encontra e na função que desempenha.

A segunda estrutura modelada foi a estrutura do lncRNA 51A. Assim como no caso de BACE1-AS, o 51A não possui estrutura terciária presente em nenhum estudo publicado até o momento. A estrutura 3D de 51A foi modelada a partir da estrutura secundária prevista anteriormente, os mesmos motivos e elementos secundários estão presentes na estrutura terciária do lncRNA 51A.

A estrutura do 51A é menos complexa devido ao seu menor comprimento e quantidade de motivos. Os motivos encontrados nessa estrutura são poucos, o que pode acabar limitando as possibilidades de interações com outras moléculas com a estrutura terciária. Esse fato pode demonstrar que 51A tenha poucos mecanismos ou apenas tenha seu papel específico na DA. Até o momento, não existe nenhuma publicação de estudo que mostre papéis de 51A com outras doenças além da DA.

Analisando a estrutura terciária de 51A, não existem motivos específicos de estruturas terciárias no 51A. Dessa forma, o 51A apenas possui motivos específicos de pareamentos pertencentes a estrutura secundária, esses motivos podem ser localizados na estrutura terciária e utilizados como possíveis locais de interações com outras moléculas, como os miRNAs presentes nos resultados.

A estrutura terciária do lncRNA 17A foi a terceira estrutura a ser modelada no projeto, e como comentado anteriormente, possui a menor sequência primária, o que determina que sua estrutura terciária seja bem menos complexa. Até o momento, não há nenhum estudo publicado que tenha modelado ou previsto as estruturas secundárias e terciárias do lncRNA 17A.

As dobras da estrutura baseadas no comprimento da sequência não formaram muitos elementos secundários e motivos específicos. Como exposto, a estrutura secundária do 17A possui três grampos em sua conformação, dois desses grampos possuem sequências parecidas em suas alças terminais, esses grampos também estão presentes e visíveis na estrutura terciária

do lncRNA. Os dois grampos podem ser considerados motivos para interações de uma molécula ou moléculas semelhantes por possuir uma alça com sequências compostas com os mesmos nucleotídeos.

Os dois grampos podem ter relação direta com o pré-mRNA de GABAB2, podendo esse pré-mRNA se parear em dois locais diferentes na estrutura de 17A, assim, aumentando a efetividade desse lncRNA em alterar o processamento do mRNA de GABAB2, gerando uma variante B. Não existem comprovações, até o momento, demonstrando a relação de 17A com outras doenças além de DA. Devido a isso, o lncRNA pode possuir uma estrutura terciária específica para pareamento com o pré-mRNA de GABAB2, sem afetar outras moléculas que não possuem relação com gene GABAB2.

A estrutura terciária do lncRNA NDM29 foi a quarta estrutura a ser modelada no projeto e possui a segunda maior sequência. Devido ao comprimento, as dobras da sequência formam diversos elementos secundários e motivos. Na estrutura existem quatro grampos que podem ser motivos, dois deles estão lado a lado na estrutura secundária, porém, na estrutura terciária não estão próximos um ao outro. Existe um espaço entre os dois grampos que pode servir como um local de interação de uma proteína ou RNAs com grande comprimento. Além dos grampos, existem alguns elementos estruturais grandes que podem ser motivos de interação.

O lncRNA NDM29 possui mais de uma função, participando em duas doenças diferentes, o neuroblastoma e a doença de Alzheimer. O lncRNA atua contra a formação de neuroblastomas e também aumenta a quantidade de peptídeos A β nos neurônios, causando a DA. Dessa forma, é possível que a estrutura terciária do lncRNA NDM29 tenha diferentes conformações baseadas na função que essa molécula irá desempenhar.

A estrutura terciária modelada neste projeto pode contribuir na compreensão do mecanismo do lncRNA NDM29 em ambas as doenças. Também há a possibilidade de apenas uma estrutura terciária regular ambas doenças por meio de seus elementos estruturais. Sendo que, às duas superexpressões de NDM29, que causam alterações no organismo, ocorrem em diferentes idades. A expressão nos neuroblastomas surge, em maioria, na infância e adolescência, e a expressão na DA ocorre em idade mais avançada (Castelnuovo et al., 2010). Devido às ocorrências em diferentes idades, a estrutura terciária pode ser mantida, porém, com motivos diferentes sendo utilizados.

A análise da estrutura de RNA pode auxiliar na descoberta de mecanismos e interações com outras moléculas. Baseado nessa ideia, buscou-se a interação de miRNAs com os lncRNAs

relacionados com a DA e com os mRNAs alvos, para investigar a possibilidade de um papel de ceRNAs para os lncRNAs. A desregulação do miRNA está envolvida em diferentes doenças neurodegenerativas, como DA e doença de Parkinson, bem como em distúrbios psiquiátricos (Esteller, 2011).

Nos últimos anos, a hipótese do ceRNAs foi validada por vários experimentos. Até agora, os mecanismos de ceRNAs foram estudados principalmente no campo da pesquisa do câncer (Karreth et al., 2015). Foi relatado que apenas um pequeno número de interações de ceRNAs está associado a distúrbios neurodegenerativos. Recentemente, começou-se a explorar o mecanismo regulador do ceRNA para doenças neurodegenerativas específicas de uma maneira sistemática (Ma et al., 2020).

Uma série de miRNAs, nomeados, miR-200a-3p, miR-195, miR-338-5p, miR-34a-5p, miR-125b-5p, miR-132, miR-384, miR-339-5p, miR-135b, miR-425-5p, e miR-339-5p, foram demonstrados como componentes presentes no desenvolvimento da DA por meio da interação com BACE1 (Samadian et al., 2021). Hebert e colaboradores (2008) relataram a regulação negativa de miR-9 no córtex da DA em comparação com o córtex de controle da mesma idade, além disso, as proteínas BACE1 e PSEN1 foram ambas identificadas como alvos potenciais de miR-9.

BACE1-AS atua como um RNA endógeno competidor (ceRNA), compartilhando elementos de resposta de miRNA com BACE1, incluindo miR-29, miR-107, miR-124, miR-485 e miR-761 (Zeng et al., 2019). Foi demonstrado que BACE1-AS também sequestra o miRNA miR-214-3p e altera a homeostase da autofagia (He et al., 2020). Além disso, BACE1-AS é um ceRNA para miR-132-3p, regulado negativamente em pacientes com DA e demonstrou fornecer proteção neuronal por meio da modulação de mRNAs alvo (Ge et al., 2020).

Considerando o fato que BACE1-AS e o mRNA de BACE1 possuem interações diretas com miRNAs, e que BACE1-AS sequestra miRNAs que interagem com BACE1, modificando sua regulação, há possibilidade de 51A, 17A e NDM29 possuírem também papéis de ceRNAs. Além disso, os resultados podem propor miRNAs que possam silenciar os lncRNAs relacionados com a DA.

Os resultados de nosso estudo mostraram que BACE1-AS e BACE1 são afetados por 17 miRNAs diferentes, esses miRNAs podendo ser sequestrados por BACE1-AS, impedindo a regulação de BACE1 por esse miRNAs. Os miRNAs hsa-let-7b-5p, hsa-let-7c-5p, hsa-let-7e-

5p, hsa-let-7g-5p e hsa-let-7i-5p foram identificados primeiramente por Lagos-Quintana e colaboradores (2001). Esses miRNAs interagem com a mesma sequência de BACE1-AS, notavelmente, onde existe um grampo, podendo ser um motivo específico para interação de outras moléculas. Até o momento, não existe bibliografia que mostre a relação desses miRNAs com BACE1-AS e BACE1, sendo assim, a interação entre essas moléculas é algo novo.

A análise da interação das estruturas 3D de BACE1-AS com os miRNAs hsa-let-7b-5p, hsa-let-7c-5p, hsa-let-7e-5p, hsa-let-7g-5p e hsa-let-7i-5p foi confirmada por meio da ferramenta HNADOCK (He et al., 2019), ferramenta utilizada para predição de interações de estruturas de RNAs. A interação com o miRNA hsa-let-7b-5p possui -169.68 kcal/mol e interage com 3 nucleotídeos, porém não houve interação com a sequência especificada “660-667”, demonstrando que esse miRNA pode não interagir nesse local na estrutura. A interação de hsa-let-7c-5p possui -205.25 kcal/mol e possui interação com apenas um nucleotídeo, sua energia é menor que do miRNA anterior, porém a interação com apenas um nucleotídeo deixa a interação improvável de ser estável. A interação de hsa-let-7e-5p possui -199.94 kcal/mol e 5 nucleotídeos interagindo, sendo 3 pertencentes a sequência especificada, essa interação é estável devido a energia baixa e estabilidade de pareamentos com os nucleotídeos. A interação de hsa-let-7g-5p possui -233.59 kcal/mol e 3 nucleotídeos interagindo, nenhum pertencendo a sequência especificada, além disso, possui uma das menores energias e bons pareamentos, essa interação pode ocorrer e ser estável. O miRNA hsa-let-7i-5p têm interação de -183.64 kcal/mol e 2 nucleotídeos interagindo, essa energia é uma das mais altas e apenas 2 nucleotídeos interagindo demonstra que essa interação pode não ocorrer, e caso ocorra, não é estável o suficiente para manter a interação.

O miRNA hsa-miR-1226-3p interage com BACE1-AS em um local onde há um loop interno. Considerando que apenas esse miRNA interage com esse local de BACE1-AS, há a possibilidade que os elementos estruturais desse local não sejam motivos específicos. Não há estudos publicados que citam a interação de hsa-miR-1226-3p, BACE1 e BACE1-AS, porém, o miRNA pode ter um papel na regulação de peptídeos A β por atuar sobre a proteína Nicastrin, uma subunidade da gama-secretase (Delay et al., 2014).

A interação da estrutura de hsa-mir-1226-3p com a estrutura de BACE1-AS possui -231.49 kcal/mol, um dos menores valores de energia livre mínima, demonstrando que essa interação é estável. Referente aos nucleotídeos, 4 nucleotídeos interagem com a estrutura de BACE1-AS, que também pode ser estável, porém, nenhum desses nucleotídeos interagem com

a sequência “229-236” especificada durante a predição da interação. Devido a isso, a estrutura do miRNA pode não interagir com essa sequência e para uma interação mais estável, esse miRNA deve interagir em outros locais.

O miRNA hsa-130a-3p interage com BACE1-AS em um local onde há hélices formadas e loops internos. Nesse local interagem mais três miRNAs: hsa-mir-130b-3p, hsa-mir-301b-3p e hsa-mir-454-3p. Por quatro miRNAs interagirem nesse local específico, é possível que se encontre motivos de interação para outras moléculas. O miRNA hsa-130a-3p não possui interação direta com BACE1 e BACE1-AS comprovada em estudos. Porém, foi demonstrado recentemente que hsa-130a-3p possui relação com DA, atenuando a neurotoxicidade induzida por A β e melhorou a função cognitiva de camundongos com DA por meio do direcionamento de DAPK1 (Wang et al., 2021). Dessa forma, um possível sequestro desse miRNA por BACE1-AS pode levar a uma disfunção, agravando a DA.

A interação de hsa-130a-3p com BACE1-AS também foi confirmada no projeto. A interação com BACE1-AS possui -226.48 kcal/mol e ocorre por meio de 4 nucleotídeos. A energia livre mínima baixa e a interação com 4 nucleotídeos podem resultar em uma interação estável, o que aumenta a probabilidade de hsa-130a-3p interagir e ser sequestrado por BACE1-AS. Nenhum nucleotídeo de interação faz parte da sequência especificada para a predição, demonstrando que esse miRNA pode interagir em outros locais para uma interação mais estável.

O miRNA hsa-mir-130b-3p interage no mesmo local que hsa-mir-130a-3p em BACE1-AS. No estudo de Nagaraj e colaboradores (2017), o hsa-mir-130b-3p foi um dos seis miRNAs estudados como possíveis marcadores de DA, porém, não obteve a expressão desejada para ser considerado um biomarcador.

Assim como o hsa-mir-130a-3p, o miRNA hsa-mir-130b-3p possui energia livre mínima baixa, um valor de -221.23 kcal/mol. Porém, esse miRNA interage com apenas 2 nucleotídeos na estrutura. Por mais que a energia livre mínima seja baixa, a interação de apenas 2 nucleotídeos torna a interação muito pouco provável de ocorrer e sem estabilidade o suficiente para que haja o sequestro por BACE1-AS.

O miRNA hsa-mir-454-3p interage no mesmo local que outros três miRNAs anteriores em BACE1-AS: hsa-mir-301b-3p, hsa-mir-130a-3p e hsa-mir-130b-3p. Foi demonstrado que hsa-mir-454-3p é regulado positivamente na DA em comparação com controles cognitivamente normais (Takousis et al., 2019).

A interação de hsa-mir-454-3p possui -171.52 kcal/mol, sendo considerada uma interação com valor de energia livre mínima baixo, mas não um dos menores em comparação com outros miRNAs das predições. Esse miRNA interage por meio de 3 nucleotídeos, sendo que nenhum deles faz parte da sequência especificada. A interação entre as estruturas de ambos RNAs pode ocorrer, porém a estabilidade pode variar devido a energia livre mínima e apenas 3 nucleotídeos interagindo.

Referente ao miRNA hsa-mir-301b-3p, até o momento não há comprovação da relação desse miRNA com BACE1 e BACE1-AS. Wang e colaboradores (2017) demonstraram que o miRNA hsa-mir-301b-3p está entre 11 miRNAs que estão conservados em humanos, previstos para terem alvos e vias sinalizadoras intimamente relacionadas com a DA.

A interação do miRNA hsa-mir-301b-3p possui quase as mesmas propriedades do hsa-mir-454-3p, energia livre mínima baixa, porém não o suficiente para comparação com as menores, e apenas 3 nucleotídeos interagindo, sendo que 2 fazem parte da sequência especificada para predição. Essa interação pode ocorrer, mas sua estabilidade pode também variar, o que pode dificultar o sequestro por BACE1-AS.

Além do hsa-mir-301b-3p, o miRNA hsa-miR-98-5p também faz parte dos 11 miRNAs citados no trabalho de Wang e colaboradores (2017). O miRNA hsa-miR-98-5p interage com o mesmo grampo que os miRNAs hsa-let-7b-5p, hsa-let-7c-5p, hsa-let-7e-5p, hsa-let-7g-5p e hsa-let-7i-5p. Esses resultados mostram que esses miRNAs podem possuir interação com BACE1 e BACE1-AS.

A interação da estrutura de hsa-mir-98-5p possui -179.97 kcal/mol de energia livre mínima e 5 nucleotídeos interagindo, sendo que 2 fazem parte da sequência especificada para interação. A energia livre mínima baixa e os pareamentos desses nucleotídeos podem resultar em uma interação estável, demonstrando que esse miRNA pode ser sequestrado por BACE1-AS e manter essa interação por um tempo considerável. Vale a pena ressaltar que esse miRNA possui relação com DA.

Os miRNAs hsa-mir-382-5p e hsa-mir-196b-5p interagem em lugares próximos na sequência de BACE1-AS, presentes em hélices que fazem parte de um multi-loop e que contém 2 loops internos e 1 bulge loop. A única associação de hsa-mir-382-5p com DA está presente no estudo de Ghanbari e colaboradores (2016), porém, não existe nenhuma ligação com BACE1 e BACE1-AS. O miRNA hsa-mir-196b-5p também não possui interação descrita com ambas moléculas.

A interação do miRNA hsa-mir-382-5p possui -276.71 kcal/mol e 3 nucleotídeos interagindo com a estrutura 3D de BACE1-AS. Essa interação possui o segundo menor valor de energia livre mínima quando comparado às outras interações do projeto. Esse valor de energia e 3 nucleotídeos interagindo, pode representar uma interação estável entre os RNAs e resultar em um sequestro do miRNA por BACE1-AS.

A interação do miRNA hsa-mir-196b-5p possui a terceira menor energia livre mínima do projeto, sendo -258.70 kcal/mol, e 5 nucleotídeos interagindo a estrutura terciária de BACE1-AS. Essa interação pode ser altamente estável devido a sua energia livre mínima baixa e a quantidade de nucleotídeos. Desse modo, a interação pode resultar no sequestro desse miRNA por BACE1-AS.

Uma observação importante deve ser feita, os miRNAs hsa-mir-382-5p e hsa-mir-196b-5p interagem no mesmo local e possuem dois dos menores valores de energia livre mínima. Esse local pode ser um local de interação ativo na estrutura terciária de BACE1-AS, devido ao fato que os miRNAs que interagem com esse local, possuem estabilidade durante o pareamento.

O miRNA hsa-mir-1303 interage em dois locais onde há um grampo e um multi-loop. Dessa forma, o hsa-mir-1303 interage em dois locais distintos onde há presença de grampos. Até o momento da publicação, não há comprovação da ação desse miRNA na DA.

A interação de hsa-mir-1303 ocorre em dois locais distintos, sendo um na sequência “9-28” e outro “633-640”. A interação na sequência “9-28” tem energia de -216.54 kcal/mol, um valor de energia livre mínima baixo comparado aos outros miRNAs. Já a sequência “633-640” possui energia de -151.65 kcal/mol, consideravelmente maior que a energia do outro local de interação. Em ambos os casos, o miRNA interage com apenas 1 nucleotídeo da estrutura 3D de BACE1-AS. Devido a esse fato, é improvável que a interação de hsa-mir-1303 seja estável e que resulte no sequestro por BACE1-AS, mesmo que o valor de energia livre mínima seja mais baixo em um dos casos.

Os miRNAs hsa-miR-625-5p, hsa-miR-500a-5p e hsa-miR-642a-5p não possuem comprovação da relação com DA, BACE1 e BACE1-AS, por estudos publicados. Dessa forma, podem ser consideradas novas interações com BACE1 e BACE-AS.

A interação de hsa-miR-625-5p pode ser considerada a melhor se comparada com os outros miRNAs, possui o menor valor de energia livre mínima, sendo -279.74 kcal/mol. Além

disso, interage com 4 nucleotídeos na estrutura de BACE1-AS. Dessa forma, a interação entre miRNA e BACE1-AS é estável, podendo resultar no sequestro do miRNA por BACE1-AS.

O miRNA hsa-mir-500a-5p interage em dois locais distintos, sendo entre as sequências de nucleotídeos “47-71” e “680-687”. A interação entre os nucleotídeos “47-71” possui -171.14 kcal/mol e interage com 4 nucleotídeos. A energia livre mínima baixa e quantidade de nucleotídeos pode resultar em uma interação estável e um possível sequestro por BACE1-AS.

Ainda sobre hsa-mir-500a-5p, a interação entre os nucleotídeos “680-687” possui -193.54 kcal/mol, um valor de energia livre mínima consideravelmente baixo, porém, apenas 2 nucleotídeos interagem com a estrutura terciária de BACE1-AS. O resultado dessa interação pode ser um pareamento não estável nesse local e com baixa possibilidade de sequestro por BACE1-AS.

A interação do miRNA hsa-mir-642a-5p ocorre em dois locais, entre as sequências “117-126” e “472-479”, possuindo energia livre mínima de -200.03 kcal/mol e -217.85 kcal/mol, respectivamente. Porém, apenas um local pode ser considerado como uma interação estável, sendo esse local presente entre a sequência “117-126”, pois, além de possuir um valor de energia livre mínima baixo, há interação entre 3 nucleotídeos na estrutura terciária de BACE1-AS. Em contrapartida, no local entre a sequência “472-479” possui apenas 2 nucleotídeos interagindo, resultando em uma interação de baixa estabilidade e baixa probabilidade de sequestro por BACE1-AS.

A análise de interação com a estrutura terciária de BACE1-AS auxiliou no reconhecimento dos miRNAs que possuem maior probabilidade de serem sequestrados pelo mecanismo ceRNA do BACE1-AS. Alguns miRNAs que foram previstos por meio da sequência primária do lncRNA não tiveram sucesso em obter uma interação estável com a estrutura terciária, o que pode ser considerado normal, pois é a estrutura terciária que opera a interação de uma molécula com outra. Outros miRNAs obtiveram sucesso em interagir com a estrutura secundária com maior estabilidade, podendo ser sequestrados por BACE1-AS. Aqui, é demonstrado que há possibilidade de BACE1-AS interagir com outros miRNAs que possuem ação na DA e que não possuem relação com a DA, proporcionando um mecanismo ceRNA altamente ativo.

Diferente do BACE1-AS, os outros três lncRNAs, 51A, 17A e NDM29, não possuem mecanismo de ceRNAs confirmados, possivelmente, por não terem o mesmo tipo de regulação que BACE1-AS. O lncRNA BACE1-AS regula positivamente o mRNA BACE1, o que

aumenta a quantidade de BACE1 e a formação de peptídeos A β . Os lncRNAs 51A e 17A regulam negativamente seus mRNAs alvos ao alterar o processamento, gerando uma proteína variante disfuncional. O lncRNA NDM29 aumenta a expressão de APP e β -secretase devido a sua superexpressão.

Para o 51A, foram encontrados apenas 2 miRNAs que podem interagir com o lncRNA e o mRNA de SORL1. O miRNA *hsa-miR-8485* e o *hsa-miR-3941*, interagem nas mesmas sequências encontradas nas estruturas de 51A. Nas duas sequências, entre os nucleotídeos “52 – 59” e “69 – 75”, há dois *loops* internos em cada sequência, que podem ser motivos de interação com outras moléculas.

Não há na literatura, algo que relacione os miRNAs *hsa-miR-8485* e *hsa-miR-3941* com 51A e SORL1. Porém, ainda pouco se sabe sobre as interações desses miRNAs com outras moléculas. O papel de *hsa-miR-8485*, foi elucidado por Fan e colaboradores (2014), e demonstraram que o miRNA reprime a expressão de NRXN1 (neurexina 1) ligando-se a TDP-43. O *hsa-miR-3941* possui mais mecanismos encontrados, tendo como alvo a proteína de ligação à imunoglobulina 1 (IGBP1) e a regulando negativamente (Sato et al., 2017); e também possui como alvo o fator de crescimento semelhante à insulina 2 (IGF2) para controlar a pneumonia aguda (Fei et al., 2018).

A análise aprofundada de interação da estrutura 3D de 51A com miRNAs possibilitou o reconhecimento dos locais de interação mais específicos nessas estruturas. O miRNA *hsa-mir-3941* interage em dois locais distintos, encontrados na sequência “52-59” e “69-75”. Referente a sequência “52-59”, a estrutura 3D de 51A não interagiu especificamente nessa sequência, apresentando de interações com outros nucleotídeos, principalmente na sequência entre os nucleotídeos “13-18”. Nesse local está presente um *bulge loop*, um elemento estrutural importante para interação de moléculas. A energia livre mínima nessa interação é de -210.76 kcal/mol, um valor considerado baixo, e demonstra que há estabilidade na interação entre ambos RNAs.

A segunda sequência prevista para *hsa-mir-3941* é entre os nucleotídeos “69-75”, porém, o miRNA não interage especificamente nesse local. Assim como na sequência “52-59”, o miRNA interagiu com o *bulge loop* encontrado na sequência “13-18”. Dessa forma, esse local onde é encontrado esse motivo, pode ser um local para interação de outras moléculas de modo estável, pois a energia livre mínima com valor de -198.25 kcal/mol pode ser considerada baixa.

O miRNA tem grande probabilidade de interagir com 51A e manter uma ligação estável, podendo haver um sequestro por mecanismo ceRNA de 51A.

O segundo miRNA que pode interagir com 51A e SORL1, é o miRNA *hsa-mir-8485*, que assim como o anterior, interage em dois locais distintos. As sequências previstas para interação desse miRNA com 51A podem ser encontradas entre os nucleotídeos “53-59” e “69-76”. Não houve interação direta com 51A na primeira sequência (53-59), a interação ocorreu entre os nucleotídeos “260-266”, onde está presente uma fita sem pareamento composta pelos últimos nucleotídeos da sequência. A interação teve o valor de -276.89 kcal/mol, sendo o segundo menor valor de energia livre mínima.

Na segunda sequência (69-76) prevista para *hsa-mir-8485*, não houve interação com essa sequência. A interação ocorreu entre os nucleotídeos “91-106”. Nesse local há a presença de um grampo, um elemento estrutural muito significativo para interação do RNA com outras moléculas. A interação é estável, sendo que o valor de energia livre mínima dessa interação é -283.80 kcal/mol, o menor valor das interações de 51A.

Dessa forma, o miRNA *hsa-mir-8485* pode interagir em locais distintos na estrutura 3D de 51A, ambos locais com elementos estruturais importantes para interação com outras moléculas. A interação é estável, o que aumenta significativamente a probabilidade de haver interação desse miRNA com 51A e um possível sequestro por 51A.

Vale ressaltar que os miRNAs *hsa-mir-3941* e *hsa-mir-8485* são moléculas que não possuem relação com a DA na bibliografia, sendo interação novas e objetos para estudos mais aprofundados sobre sua relação com DA e o lncRNA 51A.

Além dos miRNAs que podem interagir com 51A e SORL1, encontramos 25 miRNAs que podem afetar 51A. Dos 25 miRNAs que possuem a possibilidade de pareamento com 51A, apenas 3 tem relação com a DA ou outro tipo de demência. Os miRNAs *hsa-mir-362-3p* e *hsa-miR-329-3p* foram relacionados como uma parte das variantes funcionais envolvidas no desenvolvimento da DA (Ghanbari et al., 2016). Por outro lado, o miRNA *hsa-miR-101-5p* foi colocado por Burgos e colaboradores (2014), como um miRNA regulado negativamente que contribui consideravelmente para patologia da DA.

Desse modo, é possível que os 3 miRNAs que tem sua presença comprovada na DA, possam interagir com o lncRNA 51A. Notavelmente, o miRNA *hsa-miR-101-5p* está regulado negativamente, o que diminui sua quantidade no organismo e pode deixar de silenciar RNAs

que precisavam ser silenciados para defesa contra a DA, como acontece no caso do lncRNA 51A e o mRNA de SORL1.

Para o lncRNA 17A, foi encontrado apenas um miRNA que possui interação e também ao mRNA alvo, GABAB2. O miRNA *hsa-miR-4531* pode se parear em duas sequências nas estruturas do 17A, essas sendo encontradas entre os nucleotídeos “127 – 133”, apresentando apenas um *loop* interno, e “147 – 153”, encontrado na fita simples ao final da sequência da molécula. É importante notar que o miRNA interage ao final da sequência, onde há uma alça terminal formada por uma fita simples, esse local pode ser um motivo de interação para outras moléculas.

A análise da interação de *hsa-mir-4531* com a estrutura 3D de BACE1-AS resultou em interações estáveis. Porém, como o miRNA interage em dois locais diferentes, um local se destacou nessa interação. Esse local pode ser encontrado entre a sequência de nucleotídeos “147-153”, citados anteriormente na análise da estrutura secundária. Dessa forma, a sequência localizada próxima a terminação 3’ do lncRNA, pode ser um local de interação estável para outras moléculas.

Não existe estudo publicado que relacione esse miRNA com 17A ou com seu mRNA alvo GABAB2. Também não há relação do miRNA com a DA ou outro tipo de demência. O miRNA *hsa-miR-4531* apenas está relacionado com doenças autoimunes que afetam locais de interação de miRNA, conforme de Almeida e colaboradores (2018).

A presença de apenas um miRNA para 17A e GABAB2, pode mostrar que o lncRNA não possui a função de ceRNA para miRNAs que silenciam GABAB2, sendo que, até o momento, não há estudos que demonstrem que o miRNA *hsa-miR-4531* está presente em demências e possa ter interação com outras moléculas presentes na DA. A interação com a estrutura 3D é estável, o que mostra que o miRNA pode interagir com 17A, porém, permanece o questionamento sobre qual sua função sobre 17A.

Além do miRNA *hsa-miR-4531*, 11 miRNAs que podem afetar 17A foram encontrados. Dentre todos os 11 miRNAs que conseguem possivelmente regular 17A, apenas o *hsa-miR-223-3p* possui alguma relação comprovada com a DA na literatura. O *miR-223-3p* pode ter um efeito neuroprotetor nas células neuronais, tendo como alvo os receptores de glutamato, modulando o influxo de cálcio e a excitabilidade neuronal (Harraz et al., 2012). Esse miRNA, por ser relacionado como interação ao 17A, pode atuar também como neuroprotetor ao silenciar 17A e impedir a neuroinflamação causada pelo silenciamento de GABAB2.

Para o último lncRNA do projeto, o NDM29, não foi encontrado miRNAs que possam interagir com o lncRNA e com o seu alvo ASCL3, em nenhum resultado das ferramentas. Porém, foram encontrados 16 miRNAs que podem se parear com o NDM29, sendo que esses miRNAs, podem silenciar o NDM29, impedindo sua expressão e a progressão da DA, ou regulando positivamente, promovendo a DA.

Dentre os 16 miRNAs encontrados para o lncRNA NDM29, apenas um miRNA foi relacionado ao neuroblastoma, porém, não há relação com a DA na literatura. O miRNA *hsa-miR-504-3p* tem sua expressão diminuída em grupo de pacientes com neuroblastoma com alta expressão de Lamin A/C (Nardella et al., 2015). O *hsa-miR-504-3p* pode atuar como regulador de NDM29, sendo que, com sua expressão diminuída em casos de neuroblastomas, há uma diminuição da neuroproteção que pode ser causada por NDM29. Dessa forma, o *hsa-miR-504-3p* não possui um papel de silenciar NDM29.

Apesar de 17A e NDM29 não possuírem muitos miRNAs que tenham relação com doenças neurológicas ou demências, os miRNAs podem possuir ações contra esses lncRNAs e podem estudados como possíveis moléculas silenciadoras, possivelmente, impedindo a ação desses lncRNAs na DA, evitando que haja o estímulo da neuroinflamação e a formação de peptídeos A β .

Ainda com os miRNAs resultantes da pesquisa realizada, analisou-se a possibilidade de um miRNA afetar mais de uma lncRNA relacionado com DA. Notou-se que o miRNA *hsa-miR-1226-3p* pode interagir com BACE1-AS e 51A. Os miRNAs *hsa-miR-6756-5p* e *hsa-miR-6766-5p* podem interagir com os lncRNA 51A e 17A. O miRNA *hsa-miR-3941* pode interagir com 51A e NDM29. Por último, o miRNA *hsa-miR-4524a-3p* pode interagir com os lncRNAs 17A e NDM29.

Novamente, o *hsa-miR-1226-3p* tem um papel comprovado na regulação de peptídeos A β , relacionado com a γ -secretase (Delay et al., 2014). Porém, a análise da interação com a estrutura 3D de BACE1-AS resultou em uma interação com baixa estabilidade e pouca probabilidade de ocorrer. Os miRNAs *hsa-miR-6756-5p* e *hsa-miR-6766-5p* não possuem ação comprovada em nenhum tipo de demência, o que pode diminuir a capacidade de interagir com 51A e 17A.

Para os miRNAs *hsa-miR-3941* e *hsa-miR-4524a-3p* também não há na literatura, informações que comprovem sua ação em demências e possibilidade de interação com 51A e NDM29, e 17A e NDM29. Porém, ainda há a possibilidade de interação dos miRNAs com os

lncRNAs, caso fosse ocasionada uma interação entre as moléculas. Essas interações podem demonstrar que tipo de regulação que os miRNAs podem exercer nos lncRNAs.

As análises das interações com as estruturas terciárias dos lncRNAs auxiliou no reconhecimento dos miRNAs que possuem maior probabilidade de serem sequestrados pelo mecanismo ceRNA do BACE1-AS. Alguns miRNAs que foram previstos por meio das sequências primárias dos lncRNAs não tiveram sucesso em obter uma interação estável com as estruturas terciárias, o que pode ser considerado normal, pois são as estruturas terciárias que operam a interação. Outros miRNAs obtiveram sucesso em interagir com as estruturas secundárias com maior estabilidade, podendo ser sequestrados para evitar sua ação.

6. CONCLUSÃO.

A DA é um distúrbio neurodegenerativo progressivo e crônico, sendo uma doença multifatorial, que acaba limitando as opções farmacológicas pelas múltiplas vias envolvidas na patogênese. Até o momento não há terapias efetivas para DA. Mais de 300 lncRNAs apresentam expressão desregulada em pacientes com DA e estão relacionados com a patogênese. Por esse motivo, eles têm sido descritos como possíveis biomarcadores e possíveis alvos terapêuticos. Dentre os lncRNAs com expressão desregulada, quatro foram escolhidos para estudo, sendo BACE1-AS, 51A, 17A e NDM29.

No projeto, foram modeladas as estruturas secundárias e terciárias do lncRNAs relacionados com a Doença de Alzheimer. As estruturas com melhores modelos e com maior confiabilidade foram selecionadas para representar os lncRNAs, com intuito de compreender seus mecanismos e explorar os motivos possíveis baseados nas estruturas obtidas. Com a modelagem das estruturas secundárias e terciárias, é possível fazer análises de interações com proteínas, RNAs, fármacos, entre outras moléculas.

Encontramos 14 miRNAs que podem ter interação BACE1 e BACE1-AS, demonstrando que BACE1-AS pode funcionar como RNA endógeno competidor. Além de BACE1-AS, encontramos 2 miRNAs que entram em contato com 51A e SORL1 e 1 miRNA que podem interagir com 17A e GABAB2. Não foram encontrados miRNAs que afetem NDM29 e ASCL3. Esses resultados demonstram que os lncRNAs 51A pode possuir a função de sequestro de miRNAs, atuando como ceRNAs, assim como BACE1-AS. Porém, os lncRNAs 17A e NDM29 podem não possuir essa função, atuando apenas como um fator de aumento da produção de peptídeos A β .

A análise aprofundada da interação das estruturas terciárias mostrou que alguns miRNAs podem não interagir de forma estável para que haja o sequestro por BACE1-AS e outros que possuem interação estável e podem ser sequestrados por BACE1-AS. Os miRNAs notáveis, que possuem uma interação forte com a estrutura de BACE1-AS, são hsa-miR-625-5p, hsa-miR-382-5p, hsa-miR-1226-3p, hsa-miR-130a-3p e hsa-miR-196b-5p. Sendo que hsa-mir-625-5p, hsa-mir-1226-3p e hsa-mir 196b-5p podem ser consideradas interações novas por não possuírem relação com DA até o momento.

A análise de interação de 51A com os miRNAs *hsa-mir-3941* e *hsa-mir-8485* proporcionou o encontro de dois locais onde podem ocorrer interações estáveis. Para o 17A foram encontradas apenas interações com o miRNA *hsa-mir-4531*, porém, isso também possibilitou o encontro de um local onde podem ocorrer interações estáveis. Os miRNAs encontrados para 51A e 17A são moléculas que não possuem relação com a DA na bibliografia, sendo interação novas e objetos para estudos mais aprofundados sobre sua relação com DA.

Diante do exposto, a obtenção das estruturas secundárias e terciárias possibilitou a análise dos locais de pareamentos dos miRNAs e possíveis motivos localizados dentro dessas estruturas. Dessa forma, com a estrutura terciária dos lncRNAs, será possível realizar análises com outras moléculas, *in silico* ou *in vitro*, para evidenciar suas ações regulatórias nos lncRNAs. Os miRNAs que interagem apenas com os lncRNAs, que podem ou não ser relacionados a distúrbios neurodegenerativos, também podem ser analisados, sendo que, os mesmos foram previstos como miRNAs que podem interagir com os lncRNAs. Além dos miRNAs, diversas moléculas podem ser utilizadas como possíveis interações com os lncRNAs, como proteínas e fármacos, sendo usados como potenciais alvos de drogas devido ao seu efeito regulatório na patologia da DA.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

2020 Alzheimer's disease facts and figures. (2020). *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*, 10.1002/alz.12068. Advance online publication.

2021 Alzheimer's disease facts and figures. (2021). *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*, 17(3), 327–406.

Agarwal, V., Bell, G. W., Nam, J. W., & Bartel, D. P. (2015). Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *eLife*, 4, e05005.

Anderson, K. W., & Turko, I. V. (2015). Histone post-translational modifications in frontal cortex from human donors with Alzheimer's disease. *Clinical proteomics*, 12, 26.

- Ashraf, G. M., Ganash, M., & Athanasios, A. (2019). Computational analysis of non-coding RNAs in Alzheimer's disease. *Bioinformatics*, *15*(5), 351–357.
- Ballantyne, M. D., McDonald, R. A., & Baker, A. H. (2016). lncRNA/MicroRNA interactions in the vasculature. *Clinical pharmacology and therapeutics*, *99*(5), 494–501.
- Bannister, A. J., & Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell research*, *21*(3), 381–395.
- Barten, D. M., Fanara, P., Andorfer, C., Hoque, N., Wong, P. Y., Husted, K. H., Cadelina, G. W., Decarr, L. B., Yang, L., Liu, V., Fessler, C., Protassio, J., Riff, T., Turner, H., Janus, C. G., Sankaranarayanan, S., Polson, C., Meredith, J. E., Gray, G., Hanna, A., ... Albright, C. F. (2012). Hyperdynamic microtubules, cognitive deficits, and pathology are improved in tau transgenic mice with low doses of the microtubule-stabilizing agent BMS-241027. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, *32*(21), 7137–7145.
- Bednarska-Makaruk, M., Graban, A., Sobczyńska-Malefora, A., Harrington, D. J., Mitchell, M., Voong, K., Dai, L., Łojkowska, W., Bochyńska, A., Ryglewicz, D., Wiśniewska, A., & Wehr, H. (2016). Homocysteine metabolism and the associations of global DNA methylation with selected gene polymorphisms and nutritional factors in patients with dementia. *Experimental gerontology*, *81*, 83–91.
- Betancur J. G. (2016). Pervasive lncRNA binding by epigenetic modifying complexes--The challenges ahead. *Biochimica et biophysica acta*, *1859*(1), 93–101.
- Bevilacqua, P. C., Ritchey, L. E., Su, Z., & Assmann, S. M. (2016). Genome-Wide Analysis of RNA Secondary Structure. *Annual review of genetics*, *50*, 235–266.
- Burgos, K., Malenica, I., Metpally, R., Courtright, A., Rakela, B., Beach, T., Shill, H., Adler, C., Sabbagh, M., Villa, S., Tembe, W., Craig, D., & Van Keuren-Jensen, K. (2014). Profiles of extracellular miRNA in cerebrospinal fluid and serum from patients with Alzheimer's and Parkinson's diseases correlate with disease status and features of pathology. *PloS one*, *9*(5), e94839.
- Caprara, M. G., & Nilsen, T. W. (2000). RNA: versatility in form and function. *Nature structural biology*, *7*(10), 831–833.
- Case, D. A., Cheatham, T. E., 3rd, Darden, T., Gohlke, H., Luo, R., Merz, K. M., Jr, Onufriev, A., Simmerling, C., Wang, B., & Woods, R. J. (2005). The Amber biomolecular simulation programs. *Journal of computational chemistry*, *26*(16), 1668–1688.
- Castelnuovo, M., Massone, S., Tasso, R., Fiorino, G., Gatti, M., Robello, M., Gatta, E., Berger, A., Strub, K., Florio, T., Dieci, G., Cancedda, R., & Pagano, A. (2010). An Alu-like RNA promotes cell differentiation and reduces malignancy of human neuroblastoma cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *24*(10), 4033–4046.
- Cech, T. R., & Steitz, J. A. (2014). The noncoding RNA revolution-trashing old rules to forge new ones. *Cell*, *157*(1), 77–94. ,

- Chen, L., Guo, X., Li, Z., & He, Y. (2019). Relationship between long non-coding RNAs and Alzheimer's disease: a systematic review. *Pathology, research and practice*, 215(1), 12–20.
- Chen, Y., & Wang, X. (2020). miRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets. *Nucleic acids research*, 48(D1), D127–D131.
- Chi, Y., Wang, D., Wang, J., Yu, W., & Yang, J. (2019). Long Non-Coding RNA in the Pathogenesis of Cancers. *Cells*, 8(9), 1015.
- Ciarlo, E., Massone, S., Penna, I., Nizzari, M., Gigoni, A., Dieci, G., Russo, C., Florio, T., Cancedda, R., & Pagano, A. (2013). An intronic ncRNA-dependent regulation of SORL1 expression affecting A β formation is upregulated in post-mortem Alzheimer's disease brain samples. *Disease models & mechanisms*, 6(2), 424–433.
- Condello, C., & Stöehr, J. (2018). A β propagation and strains: Implications for the phenotypic diversity in Alzheimer's disease. *Neurobiology of disease*, 109(Pt B), 191–200.
- Congdon, E. E., & Sigurdsson, E. M. (2018). Tau-targeting therapies for Alzheimer disease. *Nature reviews. Neurology*, 14(7), 399–415.
- Cortini, F., Roma, F., & Villa, C. (2019). Emerging roles of long non-coding RNAs in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Ageing research reviews*, 50, 19–26.
- Crary, J. F., Trojanowski, J. Q., Schneider, J. A., Abisambra, J. F., Abner, E. L., Alafuzoff, I., Arnold, S. E., Attems, J., Beach, T. G., Bigio, E. H., Cairns, N. J., Dickson, D. W., Gearing, M., Grinberg, L. T., Hof, P. R., Hyman, B. T., Jellinger, K., Jicha, G. A., Kovacs, G. G., Knopman, D. S., ... Nelson, P. T. (2014). Primary age-related tauopathy (PART): a common pathology associated with human aging. *Acta neuropathologica*, 128(6), 755–766.
- Crews, L., & Masliah, E. (2010). Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Human molecular genetics*, 19(R1), R12–R20.
- Cruz, J. A., & Westhof, E. (2009). The dynamic landscapes of RNA architecture. *Cell*, 136(4), 604–609. h
- Cummings, J., Aisen, P., Lemere, C., Atri, A., Sabbagh, M., & Salloway, S. (2021). Aducanumab produced a clinically meaningful benefit in association with amyloid lowering. *Alzheimer's research & therapy*, 13(1), 98.
- Dann, C. E., 3rd, Wakeman, C. A., Sieling, C. L., Baker, S. C., Irnov, I., & Winkler, W. C. (2007). Structure and mechanism of a metal-sensing regulatory RNA. *Cell*, 130(5), 878–892.
- Dawson, W. K., Maciejczyk, M., Jankowska, E. J., & Bujnicki, J. M. (2016). Coarse-grained modeling of RNA 3D structure. *Methods (San Diego, Calif.)*, 103, 138–156.
- de Almeida, R. C., Chagas, V. S., Castro, M., & Petzl-Erler, M. L. (2018). Integrative Analysis Identifies Genetic Variants Associated With Autoimmune Diseases Affecting Putative MicroRNA Binding Sites. *Frontiers in genetics*, 9, 139

- De Preter, K., Vandesompele, J., Menten, B., Carr, P., Fiegler, H., Edsjö, A., Carter, N. P., Yigit, N., Waelput, W., Van Roy, N., Bader, S., Pålman, S., & Speleman, F. (2005). Positional and functional mapping of a neuroblastoma differentiation gene on chromosome 11. *BMC genomics*, *6*, 97.
- Delay, C., Dorval, V., Fok, A., Grenier-Boley, B., Lambert, J. C., Hsiung, G. Y., & Hébert, S. S. (2014). MicroRNAs targeting Nicastrin regulate A β production and are affected by target site polymorphisms. *Frontiers in molecular neuroscience*, *7*, 67.
- Delli Ponti, R., Marti, S., Armaos, A., & Tartaglia, G. G. (2017). A high-throughput approach to profile RNA structure. *Nucleic acids research*, *45*(5), e35.
- Dinamarca, M. C., Raveh, A., Schneider, A., Fritzius, T., Früh, S., Rem, P. D., Stawarski, M., Lalanne, T., Turecek, R., Choo, M., Besseyrias, V., Bildl, W., Bentrop, D., Staufenbiel, M., Gassmann, M., Fakler, B., Schwenk, J., & Bettler, B. (2019). Complex formation of APP with GABA_B receptors links axonal trafficking to amyloidogenic processing. *Nature communications*, *10*(1), 1331.
- Doshi, K. J., Cannone, J. J., Cobaugh, C. W., & Gutell, R. R. (2004). Evaluation of the suitability of free-energy minimization using nearest-neighbor energy parameters for RNA secondary structure prediction. *BMC bioinformatics*, *5*, 105.
- Dubois, B., Hampel, H., Feldman, H. H., Scheltens, P., Aisen, P., Andrieu, S., Bakardjian, H., Benali, H., Bertram, L., Blennow, K., Broich, K., Cavado, E., Crutch, S., Dartigues, J. F., Duyckaerts, C., Epelbaum, S., Frisoni, G. B., Gauthier, S., Genthon, R., Gouw, A. A., ... Proceedings of the Meeting of the International Working Group (IWG) and the American Alzheimer's Association on "The Preclinical State of AD"; July 23, 2015; Washington DC, USA (2016). Preclinical Alzheimer's disease: Definition, natural history, and diagnostic criteria. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*, *12*(3), 292–323.
- Escamilla-Ayala, A., Wouters, R., Sannerud, R., & Annaert, W. (2020). Contribution of the Presenilins in the cell biology, structure and function of γ -secretase. *Seminars in cell & developmental biology*, *105*, 12–26.
- Esteller M. (2011). Non-coding RNAs in human disease. *Nature reviews. Genetics*, *12*(12), 861–874.
- Faghihi, M. A., Modarresi, F., Khalil, A. M., Wood, D. E., Sahagan, B. G., Morgan, T. E., Finch, C. E., St Laurent, G., 3rd, Kenny, P. J., & Wahlestedt, C. (2008). Expression of a noncoding RNA is elevated in Alzheimer's disease and drives rapid feed-forward regulation of beta-secretase. *Nature medicine*, *14*(7), 723–730.
- Faghihi, M. A., Zhang, M., Huang, J., Modarresi, F., Van der Brug, M. P., Nalls, M. A., Cookson, M. R., St-Laurent, G., 3rd, & Wahlestedt, C. (2010). Evidence for natural antisense transcript-mediated inhibition of microRNA function. *Genome biology*, *11*(5), R56.
- Fan, Z., Chen, X., & Chen, R. (2014). Transcriptome-wide analysis of TDP-43 binding small RNAs identifies miR-NID1 (miR-8485), a novel miRNA that represses NRXN1 expression. *Genomics*, *103*(1), 76–82.

- Fei, S., Cao, L., & Pan, L. (2018). microRNA-3941 targets IGF2 to control LPS-induced acute pneumonia in A549 cells. *Molecular medicine reports*, *17*(3), 4019–4026.
- Feng, L., Liao, Y. T., He, J. C., Xie, C. L., Chen, S. Y., Fan, H. H., Su, Z. P., & Wang, Z. (2018). Plasma long non-coding RNA BACE1 as a novel biomarker for diagnosis of Alzheimer disease. *BMC neurology*, *18*(1), 4.
- Frankish, A., Diekhans, M., Ferreira, A. M., Johnson, R., Jungreis, I., Loveland, J., Mudge, J. M., Sisu, C., Wright, J., Armstrong, J., Barnes, I., Berry, A., Bignell, A., Carbonell Sala, S., Chrast, J., Cunningham, F., Di Domenico, T., Donaldson, S., Fiddes, I. T., García Girón, C., ... Flicek, P. (2019). GENCODE reference annotation for the human and mouse genomes. *Nucleic acids research*, *47*(D1), D766–D773.
- Fotuhi, S. N., Khalaj-Kondori, M., Hoseinpour Feizi, M. A., & Talebi, M. (2019). Long Non-coding RNA BACE1-AS May Serve as an Alzheimer's Disease Blood-Based Biomarker. *Journal of molecular neuroscience : MN*, *69*(3), 351–359.
- Gauthier, S., Feldman, H. H., Schneider, L. S., Wilcock, G. K., Frisoni, G. B., Hardlund, J. H., Moebius, H. J., Bentham, P., Kook, K. A., Wischik, D. J., Schelter, B. O., Davis, C. S., Staff, R. T., Bracoud, L., Shamsi, K., Storey, J. M., Harrington, C. R., & Wischik, C. M. (2016). Efficacy and safety of tau-aggregation inhibitor therapy in patients with mild or moderate Alzheimer's disease: a randomised, controlled, double-blind, parallel-arm, phase 3 trial. *Lancet (London, England)*, *388*(10062), 2873–2884.
- Gavazzo, P., Vassalli, M., Costa, D., & Pagano, A. (2013). Novel ncRNAs transcribed by Pol III and elucidation of their functional relevance by biophysical approaches. *Frontiers in cellular neuroscience*, *7*, 203.
- Ge, Y., Song, X., Liu, J., Liu, C., & Xu, C. (2020). The Combined Therapy of Berberine Treatment with lncRNA BACE1-AS Depletion Attenuates A β ₂₅₋₃₅ Induced Neuronal Injury Through Regulating the Expression of miR-132-3p in Neuronal Cells. *Neurochemical research*, *45*(4), 741–751.
- Geling, A., Steiner, H., Willem, M., Bally-Cuif, L., & Haass, C. (2002). A gamma-secretase inhibitor blocks Notch signaling in vivo and causes a severe neurogenic phenotype in zebrafish. *EMBO reports*, *3*(7), 688–694.
- Giri, M., Zhang, M., & Lü, Y. (2016). Genes associated with Alzheimer's disease: an overview and current status. *Clinical interventions in aging*, *11*, 665–681.
- Ghanbari, M., Ikram, M. A., de Looper, H., Hofman, A., Erkeland, S. J., Franco, O. H., & Dehghan, A. (2016). Genome-wide identification of microRNA-related variants associated with risk of Alzheimer's disease. *Scientific reports*, *6*, 28387.
- Goff, L. A., & Rinn, J. L. (2015). Linking RNA biology to lncRNAs. *Genome research*, *25*(10), 1456–1465.
- Gorodkin, J., Hofacker, I. L., Torarinsson, E., Yao, Z., Havgaard, J. H., & Ruzzo, W. L. (2010). De novo prediction of structured RNAs from genomic sequences. *Trends in biotechnology*, *28*(1), 9–19.

- Graham, W. V., Bonito-Oliva, A., & Sakmar, T. P. (2017). Update on Alzheimer's Disease Therapy and Prevention Strategies. *Annual review of medicine*, 68, 413–430.
- Gu, L., & Guo, Z. (2013). Alzheimer's A β 42 and A β 40 peptides form interlaced amyloid fibrils. *Journal of neurochemistry*, 126(3), 305–311.
- Guo, T., Noble, W., & Hanger, D. P. (2017). Roles of tau protein in health and disease. *Acta neuropathologica*, 133(5), 665–704.
- Guttman, M., & Rinn, J. L. (2012). Modular regulatory principles of large non-coding RNAs. *Nature*, 482(7385), 339–346.
- Hardy, J., & Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5580), 353–356.
- Harraz, M. M., Eacker, S. M., Wang, X., Dawson, T. M., & Dawson, V. L. (2012). MicroRNA-223 is neuroprotective by targeting glutamate receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(46), 18962–18967.
- He, J., Wang, J., Tao, H., Xiao, Y., & Huang, S. Y. (2019). HNADOCK: a nucleic acid docking server for modeling RNA/DNA-RNA/DNA 3D complex structures. *Nucleic acids research*, 47(W1), W35–W42.
- He, W., Chi, S., Jin, X., Lu, J., Zheng, W., Yan, J., & Zhang, D. (2020). Long Non-Coding RNA BACE1-AS Modulates Isoflurane-Induced Neurotoxicity to Alzheimer's Disease Through Sponging miR-214-3p. *Neurochemical research*, 45(10), 2324–2335.
- Hébert, S. S., Horré, K., Nicolai, L., Papadopoulou, A. S., Mandemakers, W., Silaharoglu, A. N., Kauppinen, S., Delacourte, A., & De Strooper, B. (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), 6415–6420.
- Hu, G., Niu, F., Humburg, B. A., Liao, K., Bendi, S., Callen, S., Fox, H. S., & Buch, S. (2018). Molecular mechanisms of long noncoding RNAs and their role in disease pathogenesis. *Oncotarget*, 9(26), 18648–18663.
- Hudry, E., Dashkoff, J., Roe, A. D., Takeda, S., Koffie, R. M., Hashimoto, T., Scheel, M., Spires-Jones, T., Arbel-Ornath, M., Betensky, R., Davidson, B. L., & Hyman, B. T. (2013). Gene transfer of human Apoe isoforms results in differential modulation of amyloid deposition and neurotoxicity in mouse brain. *Science translational medicine*, 5(212), 212ra161.
- Humphries, C., Kohli, M. A., Whitehead, P., Mash, D. C., Pericak-Vance, M. A., & Gilbert, J. (2015). Alzheimer disease (AD) specific transcription, DNA methylation and splicing in twenty AD associated loci. *Molecular and cellular neurosciences*, 67, 37–45.
- Jack, C. R., Jr, Knopman, D. S., Jagust, W. J., Petersen, R. C., Weiner, M. W., Aisen, P. S., Shaw, L. M., Vemuri, P., Wiste, H. J., Weigand, S. D., Lesnick, T. G., Pankratz, V. S., Donohue, M. C., & Trojanowski, J. Q. (2013). Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's

disease: an updated hypothetical model of dynamic biomarkers. *The Lancet. Neurology*, 12(2), 207–216.

John, B., Enright, A. J., Aravin, A., Tuschl, T., Sander, C., & Marks, D. S. (2004). Human MicroRNA targets. *PLoS biology*, 2(11), e363.

Karagkouni, D., Paraskevopoulou, M. D., Chatzopoulos, S., Vlachos, I. S., Tastsoglou, S., Kanellos, I., Papadimitriou, D., Kavakiotis, I., Maniou, S., Skoufos, G., Vergoulis, T., Dalamagas, T., & Hatzigeorgiou, A. G. (2018). DIANA-TarBase v8: a decade-long collection of experimentally supported miRNA-gene interactions. *Nucleic acids research*, 46(D1), D239–D245.

Karagkouni, D., Paraskevopoulou, M. D., Tastsoglou, S., Skoufos, G., Karavangeli, A., Pierros, V., Zacharopoulou, E., & Hatzigeorgiou, A. G. (2020). DIANA-LncBase v3: indexing experimentally supported miRNA targets on non-coding transcripts. *Nucleic acids research*, 48(D1), D101–D110.

Karplus, M., & McCammon, J. A. (2002). Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nature structural biology*, 9(9), 646–652.

Karran, E., Mercken, M., & De Strooper, B. (2011). The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nature reviews. Drug discovery*, 10(9), 698–712.

Karreth, F. A., Reschke, M., Ruocco, A., Ng, C., Chapuy, B., Léopold, V., Sjoberg, M., Keane, T. M., Verma, A., Ala, U., Tay, Y., Wu, D., Seitzer, N., Velasco-Herrera, M., Bothmer, A., Fung, J., Langellotto, F., Rodig, S. J., Elemento, O., Shipp, M. A., ... Pandolfi, P. P. (2015). The BRAF pseudogene functions as a competitive endogenous RNA and induces lymphoma in vivo. *Cell*, 161(2), 319–332.

Kerpedjiev, P., Hammer, S., Hofacker, IL. (2015). Forna (force-directed RNA): Simple and effective online RNA secondary structure diagrams. *Bioinformatics* 31(20):3377-9.

Kim, Y., Jeong, E., Jeong, J. H., Kim, Y., & Cho, Y. (2020). Structural Basis for Activation of the Heterodimeric GABA_B Receptor. *Journal of molecular biology*, 432(22), 5966–5984.

Kimura, T., Whitcomb, D. J., Jo, J., Regan, P., Piers, T., Heo, S., Brown, C., Hashikawa, T., Murayama, M., Seok, H., Sotiropoulos, I., Kim, E., Collingridge, G. L., Takashima, A., & Cho, K. (2013). Microtubule-associated protein tau is essential for long-term depression in the hippocampus. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 369(1633), 20130144.

Kinney, J. W., Bemiller, S. M., Murtishaw, A. S., Leisgang, A. M., Salazar, A. M., & Lamb, B. T. (2018). Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia (New York, N. Y.)*, 4, 575–590.

Knight, R., Khondoker, M., Magill, N., Stewart, R., & Landau, S. (2018). A Systematic Review and Meta-Analysis of the Effectiveness of Acetylcholinesterase Inhibitors and Memantine in Treating the Cognitive Symptoms of Dementia. *Dementia and geriatric cognitive disorders*, 45(3-4), 131–151.

- Kobayashi, N., Shinagawa, S., Nagata, T., Shimada, K., Shibata, N., Ohnuma, T., Kasanuki, K., Arai, H., Yamada, H., Nakayama, K., & Kondo, K. (2016). Development of Biomarkers Based on DNA Methylation in the NCAPH2/LMF2 Promoter Region for Diagnosis of Alzheimer's Disease and Amnesic Mild Cognitive Impairment. *PloS one*, *11*(1), e0146449.
- Kopp, F., & Mendell, J. T. (2018). Functional Classification and Experimental Dissection of Long Noncoding RNAs. *Cell*, *172*(3), 393–407.
- Kozomara, A., Birgaoanu, M., & Griffiths-Jones, S. (2019). miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic acids research*, *47*(D1), D155–D162.
- Kritsilis, M., V Rizou, S., Koutsoudaki, P. N., Evangelou, K., Gorgoulis, V. G., & Papadopoulos, D. (2018). Ageing, Cellular Senescence and Neurodegenerative Disease. *International journal of molecular sciences*, *19*(10), 2937.
- Kumar, A., Sidhu, J., Goyal, A., & Tsao, J. W. (2020). Alzheimer Disease. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Lodish, H. F., Berk, A., Kaiser, C., Krieger, M., Scott, M. P., Bretscher, A., Ploegh, H. L., ... Matsudaira, P. T. (2007). *Molecular cell biology*. New York: W.H. Freeman.
- Laing, C., & Schlick, T. (2010). Computational approaches to 3D modeling of RNA. *Journal of physics. Condensed matter : an Institute of Physics journal*, *22*(28), 283101
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science (New York, N.Y.)*, *294*(5543), 853–858.
- Lambert, J. C., & Amouyel, P. (2011). Genetics of Alzheimer's disease: new evidences for an old hypothesis?. *Current opinion in genetics & development*, *21*(3), 295–301.
- Lee, J. H., Barral, S., & Reitz, C. (2008). The neuronal sortilin-related receptor gene SORL1 and late-onset Alzheimer's disease. *Current neurology and neuroscience reports*, *8*(5), 384–391.
- Lei, X., Lei, L., Zhang, Z., Zhang, Z., & Cheng, Y. (2015). Downregulated miR-29c correlates with increased BACE1 expression in sporadic Alzheimer's disease. *International journal of clinical and experimental pathology*, *8*(2), 1565–1574.
- Lewis, B. P., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, *120*(1), 15–20.
- Li, B., Cao, Y., Westhof, E., & Miao, Z. (2020). Advances in RNA 3D Structure Modeling Using Experimental Data. *Frontiers in genetics*, *11*, 574485.
- Liljegren, M., Landqvist Waldö, M., Rydbeck, R., & Englund, E. (2018). Police Interactions Among Neuropathologically Confirmed Dementia Patients: Prevalence and Cause. *Alzheimer disease and associated disorders*, *32*(4), 346–350.

- Liu, T., Huang, Y., Chen, J., Chi, H., Yu, Z., Wang, J., & Chen, C. (2014). Attenuated ability of BACE1 to cleave the amyloid precursor protein via silencing long noncoding RNA BACE1-AS expression. *Molecular medicine reports*, *10*(3), 1275–1281.
- Liu, W., & Wang, X. (2019). Prediction of functional microRNA targets by integrative modeling of microRNA binding and target expression data. *Genome biology*, *20*(1), 18.
- Lowe, V. J., Lundt, E. S., Albertson, S. M., Przybelski, S. A., Senjem, M. L., Parisi, J. E., Kantarci, K., Boeve, B., Jones, D. T., Knopman, D., Jack, C. R., Jr, Dickson, D. W., Petersen, R. C., & Murray, M. E. (2019). Neuroimaging correlates with neuropathologic schemes in neurodegenerative disease. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*, *15*(7), 927–939.
- Lu, T. P., Lee, C. Y., Tsai, M. H., Chiu, Y. C., Hsiao, C. K., Lai, L. C., & Chuang, E. Y. (2012). miRSystem: an integrated system for characterizing enriched functions and pathways of microRNA targets. *PloS one*, *7*(8), e42390.
- Luck, K., Kim, D. K., Lambourne, L., Spirohn, K., Begg, B. E., Bian, W., Brignall, R., Cafarelli, T., Campos-Laborie, F. J., Charlotiaux, B., Choi, D., Coté, A. G., Daley, M., Deimling, S., Desbuleux, A., Dricot, A., Gebbia, M., Hardy, M. F., Kishore, N., Knapp, J. J., ... Calderwood, M. A. (2020). A reference map of the human binary protein interactome. *Nature*, *580*(7803), 402–408.
- Luo, Q., & Chen, Y. (2016). Long noncoding RNAs and Alzheimer's disease. *Clinical interventions in aging*, *11*, 867–872.
- Ma, Q. L., Galasko, D. R., Ringman, J. M., Vinters, H. V., Edland, S. D., Pomakian, J., Ubeda, O. J., Rosario, E. R., Teter, B., Frautschy, S. A., & Cole, G. M. (2009). Reduction of SorLA/LR11, a sorting protein limiting beta-amyloid production, in Alzheimer disease cerebrospinal fluid. *Archives of neurology*, *66*(4), 448–457.
- Ma, N., Tie, C., Yu, B., Zhang, W., & Wan, J. (2020). Identifying lncRNA-miRNA-mRNA networks to investigate Alzheimer's disease pathogenesis and therapy strategy. *Aging*, *12*(3), 2897–2920.
- Maccioni, R. B., González, A., Andrade, V., Cortés, N., Tapia, J. P., & Guzmán-Martínez, L. (2018). Alzheimer's Disease in the Perspective of Neuroimmunology. *The open neurology journal*, *12*, 50–56.
- Makarova, J. A., Shkurnikov, M. U., Wicklein, D., Lange, T., Samatov, T. R., Turchinovich, A. A., & Tonevitsky, A. G. (2016). Intracellular and extracellular microRNA: An update on localization and biological role. *Progress in histochemistry and cytochemistry*, *51*(3-4), 33–49.
- Mandelkow, E., von Bergen, M., Biernat, J., & Mandelkow, E. M. (2007). Structural principles of tau and the paired helical filaments of Alzheimer's disease. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, *17*(1), 83–90.
- Massone, S., Vassallo, I., Fiorino, G., Castelnuovo, M., Barbieri, F., Borghi, R., Tabaton, M., Robello, M., Gatta, E., Russo, C., Florio, T., Dieci, G., Cancedda, R., & Pagano, A. (2011). 17A, a novel non-coding RNA, regulates GABA B alternative splicing and signaling in

response to inflammatory stimuli and in Alzheimer disease. *Neurobiology of disease*, 41(2), 308–317.

Massone, S., Ciarlo, E., Vella, S., Nizzari, M., Florio, T., Russo, C., Cancedda, R., & Pagano, A. (2012). NDM29, a RNA polymerase III-dependent non-coding RNA, promotes amyloidogenic processing of APP and amyloid β secretion. *Biochimica et biophysica acta*, 1823(7), 1170–1177.

Mathews D. H. (2006). Revolutions in RNA secondary structure prediction. *Journal of molecular biology*, 359(3), 526–532.

Mathews, D. H., Moss, W. N., & Turner, D. H. (2010). Folding and finding RNA secondary structure. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(12), a003665.

Miao, Z., & Westhof, E. (2017). RNA Structure: Advances and Assessment of 3D Structure Prediction. *Annual review of biophysics*, 46, 483–503.

Millan M. J. (2017). Linking deregulation of non-coding RNA to the core pathophysiology of Alzheimer's disease: An integrative review. *Progress in neurobiology*, 156, 1–68..004.

Mirbahai, L., & Chipman, J. K. (2014). Epigenetic memory of environmental organisms: a reflection of lifetime stressor exposures. *Mutation research. Genetic toxicology and environmental mutagenesis*, 764-765, 10–17.

Mocanu, M. M., Nissen, A., Eckermann, K., Khlistunova, I., Biernat, J., Drexler, D., Petrova, O., Schönig, K., Bujard, H., Mandelkow, E., Zhou, L., Rune, G., & Mandelkow, E. M. (2008). The potential for beta-structure in the repeat domain of tau protein determines aggregation, synaptic decay, neuronal loss, and coassembly with endogenous Tau in inducible mouse models of tauopathy. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(3), 737–748.

Modarresi, F., Faghihi, M. A., Patel, N. S., Sahagan, B. G., Wahlestedt, C., & Lopez-Toledano, M. A. (2011). Knockdown of BACE1-AS Nonprotein-Coding Transcript Modulates Beta-Amyloid-Related Hippocampal Neurogenesis. *International journal of Alzheimer's disease*, 2011, 929042.

Nacarelli, T., Liu, P., & Zhang, R. (2017). Epigenetic Basis of Cellular Senescence and Its Implications in Aging. *Genes*, 8(12), 343.

Nagano, T., & Fraser, P. (2011). No-nonsense functions for long noncoding RNAs. *Cell*, 145(2), 178–181.

Nagaraj, S., Laskowska-Kaszub, K., Dębski, K. J., Wojsiat, J., Dąbrowski, M., Gabryelewicz, T., Kuźnicki, J., & Wojda, U. (2017). Profile of 6 microRNA in blood plasma distinguish early stage Alzheimer's disease patients from non-demented subjects. *Oncotarget*, 8(10), 16122–16143.

Nakamura, A., Kaneko, N., Villemagne, V. L., Kato, T., Doecke, J., Doré, V., Fowler, C., Li, Q. X., Martins, R., Rowe, C., Tomita, T., Matsuzaki, K., Ishii, K., Ishii, K., Arahata, Y.,

Iwamoto, S., Ito, K., Tanaka, K., Masters, C. L., & Yanagisawa, K. (2018). High performance plasma amyloid- β biomarkers for Alzheimer's disease. *Nature*, *554*(7691), 249–254.

Nardella, M., Guglielmi, L., Musa, C., Iannetti, I., Maresca, G., Amendola, D., Porru, M., Carico, E., Sessa, G., Camerlingo, R., Dominici, C., Megiorni, F., Milan, M., Bearzi, C., Rizzi, R., Pirozzi, G., Leonetti, C., Bucci, B., Mercanti, D., Felsani, A., ... D'Agnano, I. (2015). Down-regulation of the Lamin A/C in neuroblastoma triggers the expansion of tumor initiating cells. *Oncotarget*, *6*(32), 32821–32840

National Center for Biotechnology Information (NCBI). Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information (1988). Acesso em: 20 de agosto, 2021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Nie, Y., Li, Y., Xu, Y., Jiao, Y., & Li, W. (2020). Long non-coding RNA BACE1-AS is an independent unfavorable prognostic factor in liver cancer. *Oncology letters*, *20*(5), 202.

Nortley, R., Korte, N., Izquierdo, P., Hirunpattarasilp, C., Mishra, A., Jaunmuktane, Z., Kyrargyri, V., Pfeiffer, T., Khennouf, L., Madry, C., Gong, H., Richard-Loendt, A., Huang, W., Saito, T., Saido, T. C., Brandner, S., Sethi, H., & Attwell, D. (2019). Amyloid β oligomers constrict human capillaries in Alzheimer's disease via signaling to pericytes. *Science (New York, N.Y.)*, *365*(6450), eaav9518.

O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in endocrinology*, *9*, 402.

Pagano, A., Castelnovo, M., Tortelli, F., Ferrari, R., Dieci, G., & Cancedda, R. (2007). New small nuclear RNA gene-like transcriptional units as sources of regulatory transcripts. *PLoS genetics*, *3*(2), e1.

Pankiewicz, J. E., Guridi, M., Kim, J., Asuni, A. A., Sanchez, S., Sullivan, P. M., Holtzman, D. M., & Sadowski, M. J. (2014). Blocking the apoE/A β interaction ameliorates A β -related pathology in APOE ϵ 2 and ϵ 4 targeted replacement Alzheimer model mice. *Acta neuropathologica communications*, *2*, 75.

Pastori, C., & Wahlestedt, C. (2012). Involvement of long noncoding RNAs in diseases affecting the central nervous system. *RNA biology*, *9*(6), 860–870.

Piaceri, I., Raspanti, B., Tedde, A., Bagnoli, S., Sorbi, S., & Nacmias, B. (2015). Epigenetic modifications in Alzheimer's disease: cause or effect?. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, *43*(4), 1169–1173.

Pierce, B.A. (2011). *Genética Um Enfoque Conceitual*. RJ: Guanabara Koogan.

Plassman, B. L., Havlik, R. J., Steffens, D. C., Helms, M. J., Newman, T. N., Drosdick, D., Phillips, C., Gau, B. A., Welsh-Bohmer, K. A., Burke, J. R., Guralnik, J. M., & Breitner, J. C. (2000). Documented head injury in early adulthood and risk of Alzheimer's disease and other dementias. *Neurology*, *55*(8), 1158–1166.

Ponting, C. P., Oliver, P. L., & Reik, W. (2009). Evolution and functions of long noncoding RNAs. *Cell*, *136*(4), 629–641.

- Prusiner S. B. (2012). Cell biology. A unifying role for prions in neurodegenerative diseases. *Science (New York, N.Y.)*, 336(6088), 1511–1513.
- Pucci, F., & Schug, A. (2019). Shedding light on the dark matter of the biomolecular structural universe: Progress in RNA 3D structure prediction. *Methods (San Diego, Calif.)*, 162-163, 68–73.
- Qiu, C., Kivipelto, M., & von Strauss, E. (2009). Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention. *Dialogues in clinical neuroscience*, 11(2), 111–128.
- Qiu, G., Xu, C., Guo, Q., & Zhu, F. Q. (2021). SORL1 mutations are associated with parkinsonian and psychiatric features in Alzheimer disease: Case reports.
- Quinn, J. P., Corbett, N. J., Kellett, K., & Hooper, N. M. (2018). Tau Proteolysis in the Pathogenesis of Tauopathies: Neurotoxic Fragments and Novel Biomarkers. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 63(1), 13–33.
- Quinn, J. J., & Chang, H. Y. (2016). Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. *Nature reviews. Genetics*, 17(1), 47–62.
- Quintanilla, R. A., Orellana, D. I., González-Billault, C., & Maccioni, R. B. (2004). Interleukin-6 induces Alzheimer-type phosphorylation of tau protein by deregulating the cdk5/p35 pathway. *Experimental cell research*, 295(1), 245–257.
- Reeder, J., Höchsmann, M., Rehmsmeier, M., Voss, B., & Giegerich, R. (2006). Beyond Mfold: recent advances in RNA bioinformatics. *Journal of biotechnology*, 124(1), 41–55.
- Rother, M., Rother, K., Puton, T., & Bujnicki, J. M. (2011). ModeRNA: a tool for comparative modeling of RNA 3D structure. *Nucleic acids research*, 39(10), 4007–4022.
- Salmena, L., Poliseno, L., Tay, Y., Kats, L., & Pandolfi, P. P. (2011). A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language?. *Cell*, 146(3), 353–358.
- Samadian, M., Gholipour, M., Hajiesmaeili, M., Taheri, M., & Ghafouri-Fard, S. (2021). The Eminent Role of microRNAs in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Frontiers in aging neuroscience*, 13, 641080.
- Sato, T., Shiba-Ishii, A., Kim, Y., Dai, T., Husni, R. E., Hong, J., Kano, J., Sakashita, S., Iijima, T., & Noguchi, M. (2017). miR-3941: A novel microRNA that controls IGBP1 expression and is associated with malignant progression of lung adenocarcinoma. *Cancer science*, 108(3), 536–542.
- Scheltens, P., De Strooper, B., Kivipelto, M., Holstege, H., Chételat, G., Teunissen, C. E., Cummings, J., & van der Flier, W. M. (2021). Alzheimer's disease. *Lancet (London, England)*, 397(10284), 1577–1590.
- Schramm, L., & Hernandez, N. (2002). Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters. *Genes & development*, 16(20), 2593–2620.

Schrödinger, L., & DeLano, W. (2020). *PyMOL*. Retrieved from <http://www.pymol.org/pymol>

Schroeder, R., Barta, A., & Semrad, K. (2004). Strategies for RNA folding and assembly. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 5(11), 908–919.

Seetin, M. G., & Mathews, D. H. (2012). RNA structure prediction: an overview of methods. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 905, 99–122.

Selkoe, D. J., & Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO molecular medicine*, 8(6), 595–608.

Serrano-Pozo, A., Das, S., & Hyman, B. T. (2021). APOE and Alzheimer's disease: advances in genetics, pathophysiology, and therapeutic approaches. *The Lancet. Neurology*, 20(1), 68–80.

Sharma, V. K., Mehta, V., & Singh, T. G. (2020). Alzheimer's Disorder: Epigenetic Connection and Associated Risk Factors. *Current neuropharmacology*, 18(8), 740–753

Smith, M. A., & Mattick, J. S. (2017). Structural and Functional Annotation of Long Noncoding RNAs. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1526, 65–85.

Sociedade Brasileira de Geriatria e Gerontologia. Em Dia Mundial do Alzheimer, dados ainda são subestimados, apesar de avanços no diagnóstico e tratamento da doença. 2019. Disponível em: [Em Dia Mundial do Alzheimer, dados ainda são subestimados, apesar de avanços no diagnóstico e tratamento da doença - SBBG](#). Acesso em: 11 jul. 2021.

St Laurent, G., Wahlestedt, C., & Kapranov, P. (2015). The Landscape of long noncoding RNA classification. *Trends in genetics : TIG*, 31(5), 239–251.

Tahi, F., Du T Tran, V., & Boucheham, A. (2017). In Silico Prediction of RNA Secondary Structure. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1543, 145–168.

Tan, J., & Gleeson, P. A. (2019). The role of membrane trafficking in the processing of amyloid precursor protein and production of amyloid peptides in Alzheimer's disease. *Biochimica et biophysica acta. Biomembranes*, 1861(4), 697–712.

Tang, Y., Lutz, M. W., & Xing, Y. (2019). A systems-based model of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*, 15(1), 168–171.

Takousis, P., Sadlon, A., Schulz, J., Wohlers, I., Dobricic, V., Middleton, L., Lill, C. M., Perneczky, R., & Bertram, L. (2019). Differential expression of microRNAs in Alzheimer's disease brain, blood, and cerebrospinal fluid. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*, 15(11), 1468–1477.

Tiwari, S., Atluri, V., Kaushik, A., Yndart, A., & Nair, M. (2019). Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *International journal of nanomedicine*, 14, 5541–5554.

Tsagakis, I., Douka, K., Birds, I., & Aspden, J. L. (2020). Long non-coding RNAs in development and disease: conservation to mechanisms. *The Journal of pathology*, 250(5), 480–495.

Turner, D. H., & Mathews, D. H. (2010). NNDB: the nearest neighbor parameter database for predicting stability of nucleic acid secondary structure. *Nucleic acids research*, 38(Database issue), D280–D282.

Uddin, M. S., Kabir, M. T., Rahman, M. S., Behl, T., Jeandet, P., Ashraf, G. M., Najda, A., Bin-Jumah, M. N., El-Seedi, H. R., & Abdel-Daim, M. M. (2020). Revisiting the Amyloid Cascade Hypothesis: From Anti-A β Therapeutics to Auspicious New Ways for Alzheimer's Disease. *International journal of molecular sciences*, 21(16), 5858.

U.S. Food and Drug Administration - FDA (2021, June 7). *FDA Grants Accelerated Approval for Alzheimer's Drug*. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-grants-accelerated-approval-alzheimers-drug>. Acesso em: 03 de março de 2022.

Vlachos, I. S., Paraskevopoulou, M. D., Karagkouni, D., Georgakilas, G., Vergoulis, T., Kanellos, I., Anastasopoulos, I. L., Maniou, S., Karathanou, K., Kalfakakou, D., Fevgas, A., Dalamagas, T., & Hatzigeorgiou, A. G. (2015). DIANA-TarBase v7.0: indexing more than half a million experimentally supported miRNA:mRNA interactions. *Nucleic acids research*, 43(Database issue), D153–D159.

Wan, P., Su, W., & Zhuo, Y. (2017). The Role of Long Noncoding RNAs in Neurodegenerative Diseases. *Molecular neurobiology*, 54(3), 2012–2021

Wang, J., Zhao, Y., Zhu, C., & Xiao, Y. (2015). 3dRNAscore: a distance and torsion angle dependent evaluation function of 3D RNA structures. *Nucleic acids research*, 43(10),

Wang, L. L., Min, L., Guo, Q. D., Zhang, J. X., Jiang, H. L., Shao, S., Xing, J. G., Yin, L. L., Liu, J. H., Liu, R., & Guo, S. L. (2017). Profiling microRNA from Brain by Microarray in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *BioMed research international*, 2017,

Wang, J., Wang, J., Huang, Y., & Xiao, Y. (2019). 3dRNA v2.0: An Updated Web Server for RNA 3D Structure Prediction. *International journal of molecular sciences*, 20(17), 4116.

Wang, X., Zhang, M., & Liu, H. (2019). LncRNA17A regulates autophagy and apoptosis of SH-SY5Y cell line as an in vitro model for Alzheimer's disease. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 83(4), 609–621

Wang, D., Wang, P., Bian, X., Xu, S., Zhou, Q., Zhang, Y., Ding, M., Han, M., Huang, L., Bi, J., Jia, Y., & Xie, Z. (2020). Elevated plasma levels of exosomal BACE1-AS combined with the volume and thickness of the right entorhinal cortex may serve as a biomarker for the detection of Alzheimer's disease. *Molecular medicine reports*, 22(1), 227–238.

Wang, Y., Shi, M., Hong, Z., Kang, J., Pan, H., & Yan, C. (2021). MiR-130a-3p Has Protective Effects in Alzheimer's Disease via Targeting DAPK1. *American journal of Alzheimer's disease and other dementias*, 36, 15333175211020572.

- Watson, C. T., Roussos, P., Garg, P., Ho, D. J., Azam, N., Katsel, P. L., Haroutunian, V., & Sharp, A. J. (2016). Genome-wide DNA methylation profiling in the superior temporal gyrus reveals epigenetic signatures associated with Alzheimer's disease. *Genome medicine*, 8(1), 5.
- Weingarten, J., Weingarten, M., Wegner, M., & Volkandt, W. (2017). APP-A Novel Player within the Presynaptic Active Zone Proteome. *Frontiers in molecular neuroscience*, 10, 43.
- Westhof, E., Masquida, B., & Jossinet, F. (2011). Predicting and modeling RNA architecture. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(2), a003632.
- Wu, Z., Liu, X., Liu, L., Deng, H., Zhang, J., Xu, Q., Cen, B., & Ji, A. (2014). Regulation of lncRNA expression. *Cellular & molecular biology letters*, 19(4), 561–575.
- Yao, J., Reinharz, V., Major, F., & Waldispühl, J. (2017). RNA-MoIP: prediction of RNA secondary structure and local 3D motifs from sequence data. *Nucleic acids research*, 45(W1), W440–W444.
- Yang, B., Xia, Z. A., Zhong, B., Xiong, X., Sheng, C., Wang, Y., Gong, W., Cao, Y., Wang, Z., & Peng, W. (2017). Distinct Hippocampal Expression Profiles of Long Non-coding RNAs in an Alzheimer's Disease Model. *Molecular neurobiology*, 54(7), 4833–4846.
- Yin, R. H., Yu, J. T., & Tan, L. (2015). The Role of SORL1 in Alzheimer's Disease. *Molecular neurobiology*, 51(3), 909–918.
- Xie, H., Ma, H., & Zhou, D. (2013). Plasma HULC as a promising novel biomarker for the detection of hepatocellular carcinoma. *BioMed research international*, 2013, 136106.
- Zeng, T., Ni, H., Yu, Y., Zhang, M., Wu, M., Wang, Q., Wang, L., Xu, S., Xu, Z., Xu, C., Xiong, J., Jiang, J., Luo, Y., Wang, Y., & Liu, H. (2019). BACE1-AS prevents BACE1 mRNA degradation through the sequestration of BACE1-targeting miRNAs. *Journal of chemical neuroanatomy*, 98, 87–96.
- Zhang, F., & Jiang, L. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Neuropsychiatric disease and treatment*, 11, 243–256.
- Zhang Z. (2016). Long non-coding RNAs in Alzheimer's disease. *Current topics in medicinal chemistry*, 16(5), 511–519.
- Zhang, Y., Wang, J., & Xiao, Y. (2020). 3dRNA: Building RNA 3D structure with improved template library. *Computational and structural biotechnology journal*, 18, 2416–2423.
- Zhao, Y., Huang, Y., Gong, Z., Wang, Y., Man, J., & Xiao, Y. (2012). Automated and fast building of three-dimensional RNA structures. *Scientific reports*, 2, 734.
- Zhao, Y., Alexandrov, P. N., & Lukiw, W. J. (2016). Anti-microRNAs as Novel Therapeutic Agents in the Clinical Management of Alzheimer's Disease. *Frontiers in neuroscience*, 10, 59.
- Zhou, Y., Ge, Y., Liu, Q., Li, Y. X., Chao, X., Guan, J. J., Diwu, Y. C., & Zhang, Q. (2021). LncRNA BACE1-AS Promotes Autophagy-Mediated Neuronal Damage Through The miR-214-3p/ATG5 Signalling Axis In Alzheimer's Disease. *Neuroscience*, 455, 52–64.

Zuker, M., & Stiegler, P. (1981). Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information. *Nucleic acids research*, 9(1), 133–148.

Zuker M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic acids research*, 31(13), 3406–3415.