

## TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO-GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

### O IMPACTO DO TANATOTRANSCRIPTOMA CEREBRAL NA COMPREENSÃO DE DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS

#### The Impact of Brain Thanatotranscriptome on Understanding of Neurodegenerative Diseases

Yôle Mateus Nascimento<sup>1</sup>

Paulo Roberto Martins<sup>2</sup>

#### RESUMO

As doenças neurodegenerativas caracterizam-se pela degeneração progressiva de neurônios com consequente perda de capacidade motora, cognitiva ou sensorial, e sua compreensão se faz fundamental com o número abundante e crescente de casos na sociedade. Os fatores biomoleculares associados a esses distúrbios podem ser identificados a partir da avaliação de expressão genética, com base nos transcritos de RNA. Assim, a vitalidade da compreensão dessas neuropatologias pede por pesquisas transcricionais aprofundadas, as quais são realizadas, em sua maioria, em tecidos cerebrais *post-mortem*, de modo a se basear em perfis tanatotranscriptômicos. A compreensão dos transcritos adquirida a partir desses estudos se mostra extremamente promissora até então, proporcionando uma expectativa de grandes avanços a respeito dos distúrbios neurodegenerativos e suas abordagens terapêuticas, como é observado em experimentos realizados com oligonucleotídeos antisense (ASOs) como uma alternativa de tratamento. Com base nessas informações o objetivo do trabalho foi realizar a revisão bibliográfica da correlação entre os perfis transcricionais dos genes em tecidos neuronais *post-mortem*, e sua importância no estudo e desenvolvimento de tratamentos de doenças neurodegenerativas.

**Palavras-chave:** “Transcriptoma”, “Tanatotranscriptoma” “Atividade neuronal”, “*Post-mortem*”, “Distúrbios neurodegenerativos” e “Doenças neurodegenerativas”

#### ABSTRACT

Neurodegenerative diseases are characterized by the progressive degeneration of neurons, resulting in the loss of motor, cognitive, or sensory function, and their understanding is essential given the abundant and growing number of cases in society. The biomolecular factors associated with these disorders can be identified through the evaluation of gene expression, based on RNA transcripts. Thus, the vitality of understanding these neuropathologies calls for in-depth transcriptional research, which is mostly conducted on post-mortem brain tissues, relying on thanatotranscriptomic profiles. The understanding of transcripts acquired from these studies has proven extremely promising so far, providing an expectation of significant advancements regarding neurodegenerative disorders and their therapeutic approaches, as observed in experiments conducted with antisense

---

<sup>1</sup> Graduanda do curso de biomedicina do Centro Universitário de Brasília - CEUB.

<sup>2</sup> Professor do Centro Universitário de Brasília - CEUB

oligonucleotides (ASOs) as a treatment alternative. Based on this information, the aim of this study was to conduct a literature review on the correlation between the transcriptional profiles of genes in post-mortem neuronal tissues, and their significance in the study and development of treatments for neurodegenerative diseases.

**Keywords:** “Transcriptome”, “thanatotranscriptome”, “Neuronal activity”, “Post-mortem”, “Neurodegenerative Diseases”

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças neurodegenerativas constituem um grupo de doenças que se caracterizam pela perda populacional de neurônios e pela degeneração progressiva de regiões do sistema nervoso, sendo um grupo heterogêneo em relação às suas apresentações clínicas e fisiologia subjacente. Com o número crescente de casos ao redor do mundo, essas doenças representam um problema de saúde em escala global (AGNELLO; CIACCIO, 2022; ERKKINEN; KIM; GESCHWIND, 2018). Desse modo, ainda que haja muito que não se saiba sobre os mecanismos das doenças neurodegenerativas, supõe-se que sua patogênese se trate da relação entre um conjunto complexo de fatores genéticos, epigenéticos e ambientais. Como ainda não foram desenvolvidos métodos de tratamento eficazes, muitos estudos são realizados objetivando uma maior compreensão de seus mecanismos moleculares (AGNELLO; CIACCIO, 2022).

Sabe-se que as doenças neurodegenerativas correspondem a um grande gerador de morbidade e mortalidade populacional, especialmente associadas aos grupos idosos. Os distúrbios neurodegenerativos mais comuns são a doença de Alzheimer (DA), sendo esta a mais prevalente, a doença de Parkinson idiopática (DP) e a demência frontotemporal (DFT), que se trata de um termo genérico referente a um grupo de síndromes heterogêneas causadas por degeneração neuronal nos lobos temporais frontal e anterior. Dentre os principais sintomas desencadeados, destacam-se aqueles vinculados a alterações significativas das capacidades motora, cognitiva ou sensorial dos pacientes, como bradicinesia, tremor de repouso e alterações na visão em casos de DP, a perda progressiva de memória na DA e mudanças comportamentais e emocionais em DFT, sendo esses apenas alguns exemplos. Conseqüentemente, a manifestação desses sintomas acaba prejudicando bastante a qualidade de vida dos pacientes. Tendo isso em mente, deve-se compreender a essencialidade de uma abordagem precisa e assertiva de um quadro de doença neurodegenerativa, possibilitando assim, uma orientação adequada ao seu tratamento (ERKKINEN; KIM; GESCHWIND, 2018).

Ainda na atualidade, os métodos diagnósticos de distúrbios neurodegenerativos giram em torno principalmente de análises clínicas a partir de pesquisas descritivas, envolvendo principalmente os domínios: motores, cognitivos e comportamentais. Contudo, os critérios utilizados não exploram uma gama de aspectos mais internos, como fatores genéticos e fenotípicos. Do mesmo modo, essa tática não favorece a realização de diagnósticos precoces, fundamentais para um tratamento com retorno positivo, além de que, a depender das apresentações clínicas do paciente, há diversas variáveis que dificultam a conclusão diagnóstica. Essas variáveis podem apresentar alterações sutis que são influenciadas, inclusive, pela individualidade biológica de cada pessoa, como velocidade e tempo de progressão. Logo, visando a eficácia, é necessário uma amplitude maior do leque

de possibilidades diagnósticas, com estudos mais aprofundados a respeito do assunto (LOGROSCINO; URSO; SAVICA, 2022).

Para uma melhor compreensão e desenvolvimento de tratamentos desses distúrbios, bem como outros distúrbios neurológicos e psiquiátricos, é fundamental que haja a realização de experimentos em cérebro humano. Embora considere-se que a expressão gênica *antemortem* (transcriptoma) possa estar ligada a uma série de etiologias de distúrbios, sabe-se que a disponibilidade de córtex humano fresco para esses experimentos é relativamente rara, podendo ser adquirida a partir de cirurgia cerebral em casos de distúrbios. Ainda, pesquisas elucidam que dentro de poucas horas após a morte, o número de transcritos dependentes da atividade neuronal sofre redução, perda essa que pode interferir significativamente na interpretação de estudos genômicos. No entanto, a expressão gênica *post-mortem*, também chamada de tanatotranscriptoma, é bastante explorada, sendo o tecido cerebral humano *post-mortem* o principal utilizado em estudos sobre o cérebro humano, com um intervalo *post-mortem* (IPM) médio excedente a 12 horas (DACHET et al., 2021; SCOTT et al., 2020).

Expressões gênicas tratam-se de processos pelo qual o ácido desoxirribonucleico (DNA), material genético celular, é decodificado com o intuito de realizar uma transcrição funcional, sendo denominado transcriptoma o conjunto de possibilidades transcricionais. O transcriptoma (*antemortem*) tem sido um valioso recurso de avaliações gênicas, se diferenciando de acordo com o tipo celular e tecidual. Ampliando o leque de possibilidades, os estudos de expressão genética em IPM são geralmente realizados a partir do uso de ácido ribonucleico (RNA) extraído dessas amostras. O tanatotranscriptoma envolve o estudo das transcrições de RNA mensageiro (mRNA), que ocorrem em tecidos humanos após a morte (SCOTT et al., 2020).

Esse trabalho teve como objetivo revisar a correlação entre os perfis transcricionais em tecidos neuronais *postmortem* e sua importância no estudo e desenvolvimento de tratamentos de doenças neurodegenerativas.

## 2 METODOLOGIA

O estudo realizado foi uma revisão de literatura narrativa, tendo como base a coleta de literaturas, pesquisas e artigos publicados para sua correlação e compreensão teórica, colaborando para formar argumentos e observações do pesquisador a partir do tema abordado (ROTHER, 2007).

Como bases indexadoras, foram utilizadas a Biblioteca Digital Brasileira de Teses e Dissertações (BDTD), o PubMed Central (PMC), *National Library of Medicine* (NCBI) e *Science Research*, *Science direct*, efetivando a busca com os termos norteadores “Transcriptoma”, “Tanatotranscriptoma”, “Atividade neuronal”, “*Post-mortem*”, “Distúrbios neurodegenerativos” e “Doenças neurodegenerativas”, com recrutamento de artigos científicos nos idiomas português e inglês, publicados entre o período de 2015 a 2024, salvo exceções para contextualização.

### 3 DESENVOLVIMENTO

#### 3.1 O Transcriptoma

Para que se possa compreender verdadeiramente o perfil transcriptômico *post-mortem*, deve-se ter em mente sua organização em vida, para então entender como ocorrem suas alterações durante o IPM. O transcriptoma humano é tido como o conjunto dos transcritos de RNA expressos nos tecidos do organismo, sendo determinantes no direcionamento estrutural e funcional de seus mecanismos. A expressão genética é diversificada de acordo com seus respectivos genes, de modo que o perfil transcriptômico tende a variar de acordo com as células e os tecidos em que são expressos, correspondendo aos seus papéis dentro do organismo (JAVAN et al., 2024). Diferentemente do genoma, que se mantém o mesmo em todas as células do organismo, o transcriptoma apresenta uma variedade de padrões com base em seu tipo celular e tecidual ao longo da vida humana, inclusive, podendo variar com a idade do indivíduo, expondo caráter variado de acordo com sua identidade celular específica (FUTSCHIK et al., 2020). Analogamente, a análise dos transcritos de RNA também possibilita a identificação de células saudáveis ou patológicas, além de fornecer uma compreensão mais aprofundada das causas genéticas de múltiplas patologias (LOPES et al., 2022).

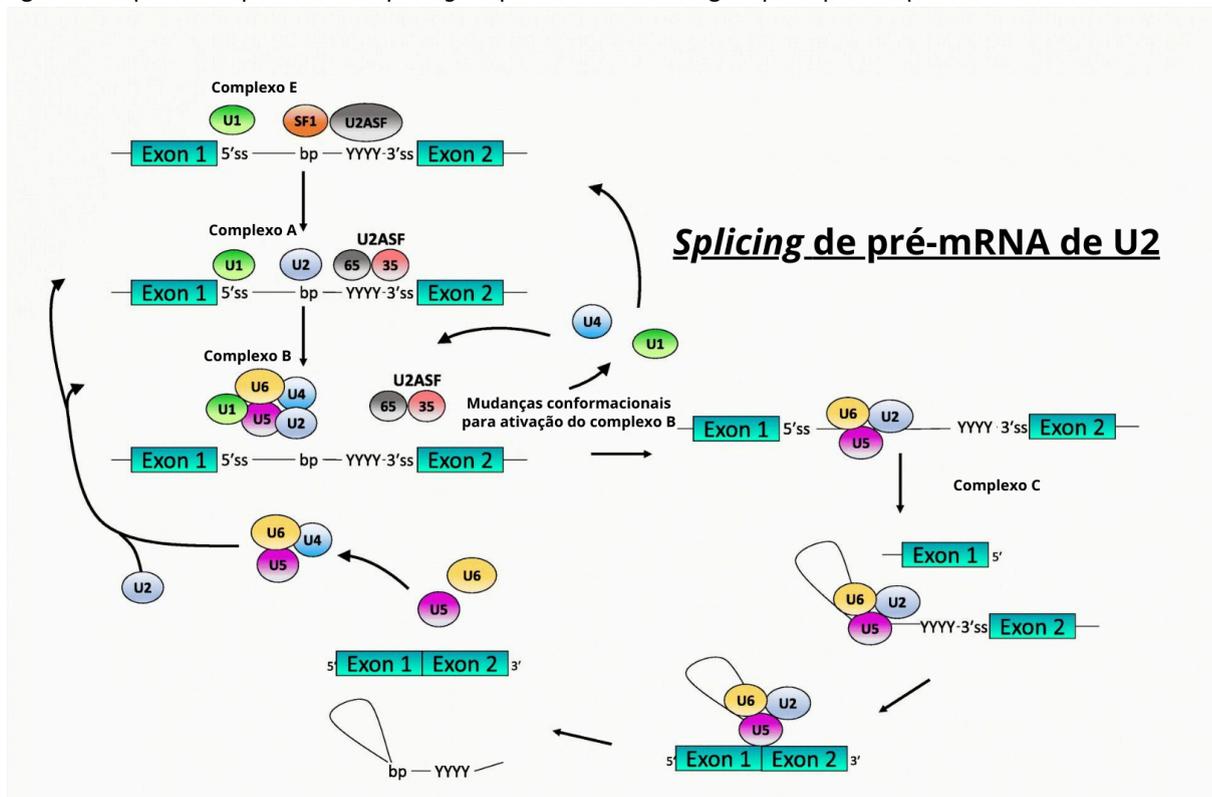
Os avanços metodológicos de detecção e sequenciamento de RNA, tais como RNA mensageiros (mRNA), RNA ribossômicos (rRNA) e microRNA (miRNA), têm se mostrado extremamente vantajosos (JAVAN et al., 2024). O desenvolvimento da tecnologia de sequenciamento de RNA (RNAseq) alavancou o aprimoramento dos métodos de documentação da expressão gênica, junto à identificação de alterações associadas a patologias. O RNAseq permite o registro de mRNAs codificadores de proteínas, miRNAs e RNAs longos não codificantes (lncRNAs) regulatórios, avaliando abundância e sequência de maneira mais sensível e específica, com uma riqueza maior de detalhes. Há células do organismo que são altamente especializadas, logo, a quantidade de genes predominantemente expressos é baixa, como é o caso da produção de hemoglobina nas células sanguíneas. Outras células, cujas atividades metabólicas são altas, possuem alta atividade transcricional relacionada à mitocôndria, como é o caso de células renais, musculares e cerebrais. Ainda, há órgãos cujas células apresentam perfis de expressão extremamente singulares, dos quais o cérebro não é deixado de fora (FUTSCHIK et al., 2020; SCOTT et al., 2020).

Sobrepondo-se a métodos anteriores, a tecnologia de RNA-seq possibilita o mapeamento e quantificação das sequências de fragmentos de RNA, diretamente a partir de seu DNA complementar (cDNA). Primeiramente, os RNAs longos presentes nas amostras coletadas são reduzidos a um conjunto de fragmentos, a partir dos quais são gerados os cDNAs. Em seguida, são adicionados adaptadores de sequenciamento, que se ligam às extremidades dos cDNAs, permitindo a identificação de sequências curtas, por meio de tecnologias de alto rendimento. Por fim, as sequências obtidas são analisadas e alinhadas ao genoma e transcriptoma, identificando os genes e transcritos correspondentes (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009), de modo que a quantidade de fragmentos de cDNA alinhados a cada gene deve ser proporcional ao seu transcriptoma (FUTSCHIK et al., 2020). Tratando-se de um método em que, a depender da tecnologia utilizada, não há necessidade de amplificação, há a vantagem de pouca amostra ser necessária. Essa técnica apresenta sinal de fundo baixo, com uma maior liberdade de confiança no mapeamento das regiões genômicas únicas, e há ausência de limite superior de quantificação. No entanto, a leitura de

transcritos ainda possui desafios, especialmente decorrentes do *splicing* alternativo, um processo prevalente dos genes humanos, dos quais mais de um terço altera sua isoforma principal em mais de 15 tecidos (VAQUERO-GARCIA et al., 2023; WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009).

Antes da formação do mRNA maduro, precursores de RNA são transcritos, os quais apresentam uma estrutura composta por *introns* e *exons* intercalados. O *splicing* é o processo em que *introns* são removidos enquanto os *exons* se conectam, para que se forme o mRNA maduro, possibilitando variedade de transcritos originados de um mesmo gene. Esse mecanismo é importante para a retirada de trechos genéticos não codificadores de proteínas (os *introns*), e para que, a partir da tradução, o mRNA formado possa desempenhar seu papel dentro da formação diversificada de componentes proteômicos (figura 1). O responsável pelo funcionamento do mecanismo de *splicing* é o spliceossomo, um complexo ribonucleoproteico, composto por 5 snRNPs (ribonucleoproteínas nucleares pequenas) e mais de 100 proteínas, definitiva ou transitoriamente associadas (PAIVA, 2016).

Figura 1. Esquema do processo de *splicing* do pré-mRNA e montagem principal do spliceossomo.



**Legenda:** A montagem inicial no Complexo E envolve a ligação do U1 snRNP (U1) ao local de splice 5 (ss), enquanto o fator de *splicing* 1 não-snRNP (SF1) e U2AF se ligam à sequência de ponto de ramificação e ao trato de polipirimidina, respectivamente. Posteriormente, o snRNP U2 é recrutado por SF1 e U2AF, substitui SF1 para se ligar ao ponto de ramificação e inicia a formação do Complexo A. O recrutamento de U2 facilita o alistamento do tri-snRNP U4/U6-U5 que é pré-montado a partir dos snRNPs U4/U6 e U5, formando assim o Complexo pré-catalítico B. Em seguida, a desestabilização de U4 e U1 leva à dissociação de U4, enquanto U6 substitui U1 nos 5'ss e dá origem ao spliceossomo ativado. Este Complexo B ativado cataliticamente inicia a primeira etapa do *splicing*, dando origem ao Complexo C que então cliva o 5'ss, liberando o primeiro éxon para se dobrar e o 5'ss pode agora se juntar ao ponto de ramificação, formando um laço dentro do íntron. Após a formação do laço vem a segunda etapa da emenda; clivagem do íntron no 3'ss, liberação do laço e ligação dos dois éxons limítrofes. Após a conclusão da etapa final, o spliceossomo se dissocia para que os snRNPs possam ser reciclados e ocorra o *splicing* de um íntron subsequente. Isso é repetido até que todos os íntrons do mRNA sejam removidos, dando origem à formação do transcrito de mRNA maduro. Após a excisão do íntron e ligação

dos exons, os U snRNPs são reciclados. As extremidades 5'ss, 3'ss, pb e polipirimidina são mostrados na linha que representa o íntron. Os exons são mostrados como caixas magenta.

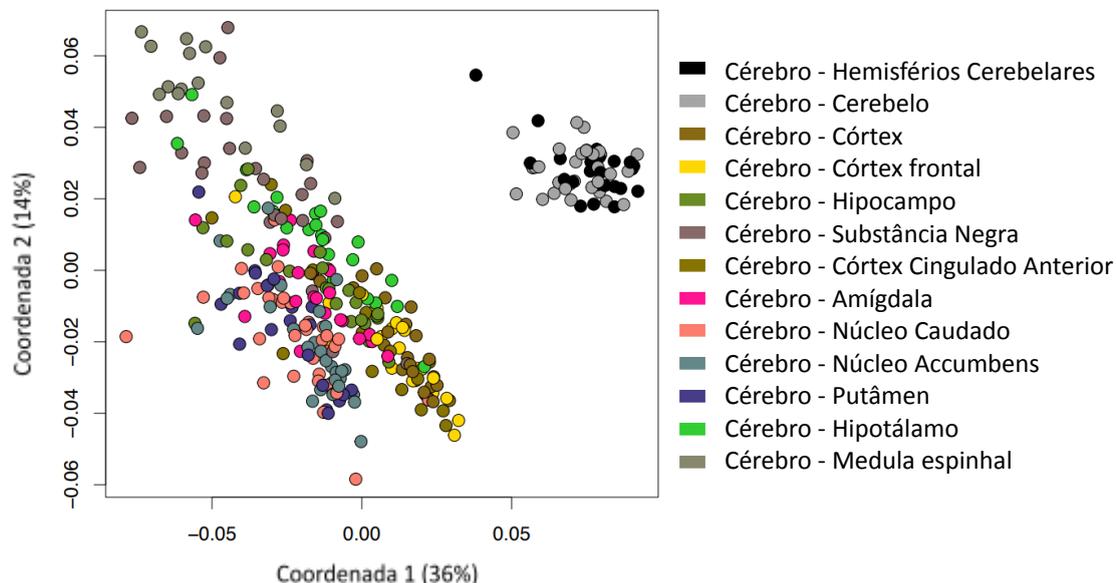
**Fonte:** Figura adaptada de Li et al. (2021).

O RNAseq é bastante explorado em investigações mais abrangentes da expressão genética, no entanto, as alterações de isoformas genéticas vem ganhando bastante atenção dentre os pesquisadores. Geradas por diversos mecanismos, e a depender das mudanças das isoformas formadas, há implicações que podem vir a ocorrer e interferir nas funcionalidades fisiológicas, como anormalidades que envolvem a proporção degradativa e a distribuição de domínios proteicos. A ciência da correlação entre o *splicing* aberrante (processo de splicing defeituoso que pode gerar proteínas anômalas) com doenças geradas por fatores genéticos (de um ou mais genes), como câncer e doenças neurodegenerativas, é um forte impulsionador para novas investigações desse mecanismo e de suas variações, de modo que exijam recursos que permitam sua detecção, quantificação e visualização (VAQUERO-GARCIA et al., 2023).

### 3.2 Transcriptoma Cerebral e Doenças Neurodegenerativas

Por meio do escalonamento multidimensional de Leituras de RNAseq em diversos tecidos humanos, pesquisas já identificaram que o *splicing* em tecido cerebral possui uma identidade única dentre os tecidos sólidos observados, enfatizando a presença de um mecanismo distinto de *splicing*. Foi observado um enriquecimento das principais expressões gênicas de proteínas de ligação com RNA, bem como da inclusão diferencial e preferencial de *exons*. Dos poucos *exons* adicionados ou retirados especificamente com relação a um tecido, 40% corresponderam a sua adição em região cerebral, cuja utilização de micro-exons (inferiores a 15 pb) também assume a liderança quando comparada aos demais órgãos. No entanto, essa particularidade transcricional vinculada ao cérebro possivelmente está associada à regulação geral de proteínas de ligação de RNA visualizada na região do cerebelo, área com maior atividade nova de *splicing*, como pode ser observado no escalonamento multidimensional (MDS) da figura 2 (FUTSCHIK et al., 2020; MELÉ et al., 2015).

Figura 2. Gráfico de Escalonamento multidimensional (MDS) de amostras cerebrais do GTEx com base na expressão gênica.



**Legenda:** Escalonamento multidimensional (MDS) de amostras cerebrais do GTEx com base na expressão gênica. Escalonamento multidimensional para amostras cerebrais com base na expressão gênica de todos os genes (RPKM transformado para  $\log_2$ , distância = 1 - correlação de Pearson). As amostras do cerebelo e cerebelares estão claramente separadas do restante dos subtecidos cerebrais.

**Fonte:** Figura adaptada de MELÉ et al. (2015).

Foram detectados 1993 genes cuja expressão é globalmente alterada com a idade, também reforça que a diminuição da expressão gênica é potencializada em mecanismos vinculados a doenças neurodegenerativas, como doença Parkinson (DP) e doença de Alzheimer (DA), em que em 8 ocorre polimorfismo de nucleotídeo único, o que é visualizado em doenças detectadas por pesquisa de ampla associação de genes ( $P < 0,05$ ) (MELÉ et al., 2015). Sabe-se que os neurônios requerem uma maior ocorrência e mudanças de *splicing* alternativo com relação a outras células, para que se mantenha o bom funcionamento durante as atividades celulares, em especial durante a neurogênese e as movimentações sinápticas, colaborando para a plasticidade e sinalização celular, além de exercer papel fundamental na apoptose. As constantes mudanças nesse processo e sua dependência de numerosos fatores de *splicing cis* e *trans* potencializam a vulnerabilidade a erros, podendo, inclusive, desencadear a degeneração de neurônios. Quando ocorrem anomalias proteicas relacionadas a erros no *splicing*, podem haver o dobramento incorreto dessas proteínas, consequentemente gerando seu acúmulo, aspecto característico de doenças neurodegenerativas (LI et al., 2021).

Outro foco de estudos que também tem sido bastante explorado diante de quadros de neurodegeneração são as células microgliciais cerebrais. A microglia trata-se de células imunes mieloides presente em tecidos nervosos, responsável por mediar processos inflamatórios, também sendo fundamental para a homeostase cerebral, neurogênese e neurodesenvolvimento. Foram avaliados os transcritos da microglia humana e relacionados a possíveis variantes genéticas relacionadas à doenças neurodegenerativas, e a partir dessas análises demonstrou-se a relação entre a expressão de USP6NL no *locus* ECHDC3 com a DA e de P2RY12 no *locus* MED12L com a DP (LOPES et al., 2022).

Dentro do grupo de RNAs não codificantes estão os chamados RNAs circulares (circRNA) exóticos, moléculas de fita única fechada, formadas a partir de um *splicing* alternativo chamado *back splicing*, no qual um sítio doador se liga a um sítio aceptor. A conformidade dos circRNAs lhes proporciona uma resistência natural a exonucleases, fazendo com que suas meias-vidas sejam de três a cinco vezes mais longas com relação a RNAs lineares. Estudos transcricionais realizados em amostras do sistema nervoso central (SNC) de humanos e camundongos já apresentaram um enriquecimento de circRNA no sistema nervoso, associando-os com atividade neuronal. Foram encontradas fortes evidências que relacionam a expressão desregulada de circRNA a distúrbios neurológicos, como DA e DP, sinalizando seu possível envolvimento na função cerebral (GIUSTI et al., 2024).

### 3.3 Patogênese de Doenças Neurodegenerativas

Cada distúrbio neurodegenerativo apresenta alterações características que possibilitam seu diagnóstico, com base em seus aspectos primários, região afetada pela neurodegeneração e anomalias moleculares inerentes. Assim, as similaridades dos mecanismos patogênicos conhecidos os enquadram em agrupamentos específicos de

doenças neurodegenerativas, dentre as quais as amiloidoses, tauopatias,  $\alpha$ -sinucleinopatias e proteinopatias TDP-43 correspondem às mais frequentes. Dentro das anomalias moleculares observadas mais comuns, estão proteínas que exibem conformações atípicas que, segundo pesquisas, são capazes de se propagar de uma célula a outra através de suas conexões anatomofisiológicas. No entanto, as deficiências funcionais de regiões nos tecidos nervosos é oriunda da correlação de múltiplos mecanismos, responsáveis por desencadear a perda progressiva de neurônios. Dentre os processos envolvidos, estão o estresse proteotóxico em conjunto com suas anomalias envolvidas, que afetam sistemas como ubiquitina-proteassômico e autofagossômico/lisossômico, estresse oxidativo, programação da morte celular e neuroinflamação (DUGGER; DICKSON, 2017).

### **3.3.1 Tauopatias**

As tauopatias se referem aos distúrbios que apresentam agregação atípica de proteínas do tipo tau em neurônios e nas células da glia, com alterações em sua estrutura. As proteínas tau são encarregadas pela estabilização dos microtúbulos neuronais. O que ocorre nessas patologias se dá pela conformação da proteína tau, que se apresenta mal dobrada, tendo como consequência a desestabilização dos microtúbulos das células nervosas, afetando assim sua estrutura e funcionalidade. Com os microtúbulos danificados, ocorre degeneração axonal com perda de sinapses, cruciais para a transmissão de informações e funções nervosas. Pode levar, inclusive, à morte celular, essa condição acaba desencadeando as deficiências funcionais correspondentes aos sintomas apresentados nas respectivas doenças. Além de englobarem a doença neurodegenerativa mais comum mundialmente (DA), são compostas por um conjunto de mais de 20 possíveis quadros diagnósticos (MONTALBANO et al., 2023).

Dentre os mais de 20 possíveis diagnósticos de tauopatias, o exemplo mais conhecido é a Doença de Alzheimer (DA), determinada pela deposição do peptídeo  $\beta$ -amilóide ( $A\beta$ ) em meio extracelular e pela geração de emaranhados neurofibrilares, resultantes de alterações químicas, em meio intracelular. Mais de 50 *loci* já foram vinculados à DA, apesar de suas funções e mecanismos associados ainda serem obscuros, mas as placas amiloides e os emaranhados neurofibrilares, característicos da doença, fornecem produtos genéticos identificáveis. Dentre as isoformas de  $A\beta$ , a  $A\beta_{42}$  é a principal constituinte das placas amiloides, com grande tendência a formar agregados. O gene encarregado pela codificação de amiloide é o APP, cuja maioria das mutações documentadas localiza-se agrupada nos *exons* 16 e 17, que expressam os locais de clivagem relevantes para a formação de diferentes isoformas de  $A\beta$  (LI et al., 2021; SOUSA, 2017).

Pesquisas já comprovaram que essas alterações estruturais proteicas estão diretamente associadas à neuroinflamação, elemento fundamental na DA, sendo observado o aumento na expressão de citocinas e interleucinas inflamatórias, causadoras desse processo. Portanto, essa ocorrência levou a estudos que buscam a correlação da DA com vários genes inflamatórios, dentre os quais já foram encontradas relações de polimorfismos a susceptibilidade de tauopatias e outros fatores nos genes: TLR6, TLR2, NLRP10, IL-1B e COL4A1, destacando TLR6, TLR2 e NLRP10 na patogênese de DA; como exposto na tabela (1) a seguir (SOUSA, 2017).

Tabela 1. Tabela de associações de polimorfismos genéticos com a Doença de Alzheimer (DA).

Gene	Locus	SNP	Associações
TLR6	4p14	rs6531669	Susceptibilidade à DA Idade de início MMSE
TLR2	4q31.3	rs13105517	Susceptibilidade à DA MMSE
NLRP10	11p15.4	rs9919613	Susceptibilidade à DA Idade de início Gravidade da DA
IL-1B	2q14.1	rs1143643	Idade de início Gravidade da DA
COL4A1	13q34	rs613430	Gravidade da DA

**Fonte:** Adaptado de SOUSA (2017).

SNP - Polimorfismos de nucleotídeo único;

MMSE - Mini Mental State Examination - Exame do Estado Mini Mental.

### 3.3.2 Proteinopatias TDP-43 e Alfa-Sinucleinopatias

As proteinopatias TDP-43 são as doenças cuja causa é originada do acúmulo de agregados da proteína nuclear TDP-43. A TDP-43 compreende uma estrutura que exerce diversas funções moduladoras, incluindo modulação do *splicing*, a metabolização de RNA, regulação de grânulos de estresse e também age reprimindo a atividade transcricional. No entanto, apesar de se tratar de uma proteína indispensável para as funcionalidades fisiológicas, pode ocorrer a formação de corpos de inclusão não apenas em espaço nuclear, mas em variadas partes da célula, como na região citoplasmática e atividade citológica. A formação desses agregados pode ser identificada em doenças como Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) e em demência frontotemporal (DFT). A ELA corresponde a uma doença progressiva fatal em que ocorre a perda populacional seletiva de neurônios motores superiores e inferiores. O tipo neuropatológico de DFT mais incidente possui relação com a TDP-43, sendo comum em pessoas com idade inferior a 65 anos e podendo ocorrer em conjunto com ELA (DUGGER; DICKSON, 2017; LI et al., 2021).

Os fatores genéticos envolvidos nessas doenças envolvem um aumento da expressão da proteína de ligação ao DNA TAR (TARDBP), FUS, hnRNPA1, Domínio Coiled-Coil-Helix-Coiled-Coil-Helix Contendo 10 (CHCHD10) e, especialmente, do gene do quadro de leitura aberto 72 do cromossomo 9 (C9ORF72). Até então, considera-se que o principal fator genético causador de ELA e DFT é a expansão da repetição do hexanucleotídeo G4C2 localizada no íntron inicial ou na região promotora do gene C9ORF72. Dentro dos mecanismos patológicos, a repetição de RNA que causa expressão de proteínas tóxicas, geram depósitos em numerosas regiões do cérebro e as proteínas originadas do *splicing* aberrante de C9ORF72 favorecem a citotoxicidade (LI et al., 2021).

O TARDBP é o gene que modula o *splicing* de RNA de hnRNPs e expressa a proteína 43 de ligação ao DNA TAR (TDP-43). A mutação de TARDBP causa alterações no *splicing*, levando a inclusão do exon7B e ao acúmulo da forma citotóxica de hnRNPA1 A1B. Outros defeitos de *splicing* relacionados ao fenótipos de ELA e DFT foram os dos genes da senataxina (SETX) e

da optineurina (OPTN) (LI et al., 2021). Entretanto, não apenas em proteinopatias TDP-43, essas alterações também podem ser encontradas em outras doenças como na DA (25 a 50%), principalmente quando há Degeneração Granulovacuolar (DGA), e em quadros de esclerose hipocampal em idosos, relacionada à ocorrência de perda de memória (DUGGER; DICKSON, 2017).

A classe de alfa sinucleinopatias é constituída de neurodegenerações geradas a partir da proteína  $\alpha$ -sinucleína ( $\alpha$ Syn), que se agrega nos tecidos cerebrais, formando os chamados corpos de Lewy e neuritos de Lewy, característicos de Doença de Parkinson (DP) e da demência com corpos de Lewy (DLB), assim como também é visível na sinucleinopatia atrofia multissistêmica (AMS). A  $\alpha$ Syn possui um perfil pré-sináptico e é potencialmente expressa no citosol das células nervosas. As alfa sinucleinopatias podem ser diagnosticadas com base em análises clínicas, com a análise dos padrões de distribuição proteica anatômica, levando em consideração que esses tipos de distúrbios podem ser diferenciados e identificados por apresentações clínicas consideravelmente distintas (DAVIS; LEYNS; HOLTZMAN, 2018).

Embora as atribuições dentro dos mecanismos do sistema nervoso da  $\alpha$ -Syn ainda sejam obscuras, várias pesquisas supõem que esteja relacionada com processos inibitórios de neurotransmissores. Há também sugestões de como ocorre o processo de formação dos agregados de  $\alpha$ -Syn, acreditando-se que sua origem se dê na mucosa periférica, percorrendo o organismo até alcançar o sistema nervoso central (SNC), onde se formam os agregados  $\alpha$ -Syn a princípio, se alastrando de neurônios doentes para saudáveis, até atingir regiões de risco maior como as límbicas e as neocorticais (PENG; GATHAGAN; LEE, 2018).

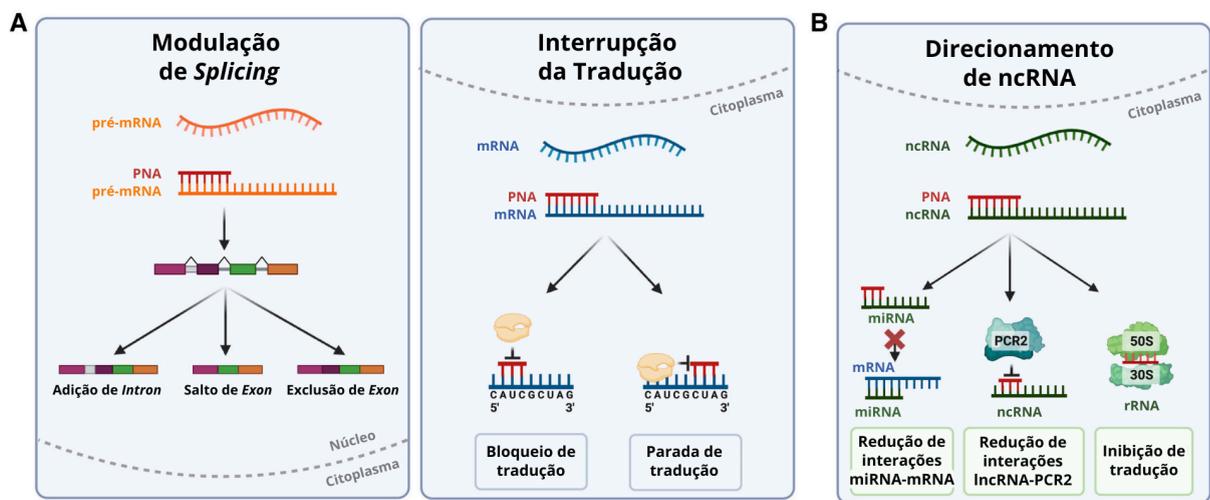
A  $\alpha$ Syn é um componente responsável por regular a liberação e transporte de vesículas sinápticas, e cujo gene por sua codificação é o SNCA. Mutações nesse gene, como duplicação ou triplicação de SNCA e *missense* (mudança de um único par de base causa a substituição de um aminoácido diferente na proteína resultante), podem causar um aumento da expressão e dobramento incorreto da proteína  $\alpha$ Syn, com conseqüente acúmulo e prejuízos moleculares. A propensão a sua agregação são causadas por alterações anormais do *splicing* alternativo oriundo das mutações genéticas. Há também outras alterações de *splicing* de genes associadas a essas patologias, como a repetição no receptor leucina quinase de LRRK2 principalmente gerada por *missense* e mutações homozigóticas ou heterozigóticas compostas em PARK2 (LI et al., 2021).

### 3.4 Oligonucleotídeos Antisense e Potenciais Alvos Terapêuticos

Considerando as possibilidades terapêuticas a serem exploradas em neurodegenerações, os oligonucleotídeos antisense (ASOs, do inglês *Antisense oligonucleotides*), que são cadeias curtas (de 12 a 15 nucleotídeos) sintéticas de ácido nucleico de fita simples, têm se mostrado uma opção extremamente promissora. Seu mecanismo de funcionamento tem como alvos DNA e RNA, o que inclui pré-mRNA, mRNA e ncRNA, de modo que sua especificidade pode ser projetada de acordo com o respectivo objetivo molecular e genético, com base na sequência alvo. Com a ação dos ASOs, pode-se obter efeitos redutores ou potencializadores da expressão de proteínas, alteradores ou de corretores do processo de *splicing* (onde são chamados de *splice switchers*) (QUEMENER et al., 2020). Considerando a expressão de proteínas anormais característica de doenças neurodegenerativas, os ASOs podem ser utilizados para a alteração ou degradação de RNA, ligando-se pelo emparelhamento de bases de Watson-Crick, com a conseqüente regulação do RNA alvo (EVERS; TOONEN; ROON-MOM, 2015).

Um tipo de ASO que tem sido bastante utilizado é o ácido nucleico peptídico (PNA), um análogo de ácido nucleico que possui uma estrutura neutra de N-(2-aminoetil)glicina, lhe proporcionando uma resistência maior à degradação enzimática, maior força iônica e estabilidade, além de baixa repulsão eletrostática contra seus alvos. Essas propriedades lhe proporcionam uma identidade físico-química única quando comparada a outras alternativas de ASO, com aplicações bem sucedidas em casos de neurodegeneração. Seu funcionamento tem como princípios a modulação de *splicing* ou a interrupção do processo de tradução, podendo mirar em pré-mRNA presente no núcleo, para a modulação de *splicing*, e em mRNA ou ncRNA no citoplasma, para parada ou bloqueio transcricional, como exposto na figura (3). (MACLELLAND; KRAVITZ; GUPTA, 2023).

Figura 3. Esquema mostrando mecanismos de ação do PNA.



Legenda: (A) PNA visando pré-mRNA através de modulações de *splicing* e direcionamento de mRNA através de bloqueio translacional e parada translacional. (B) PNA visando vários ncRNAs. O PNA liga-se ao ncRNA e evita sua interação com os locais de ligação do rRNA e do mRNA.

Fonte: Figura adaptada de MACLELLAND, KRAVITZ, GUPTA (2023).

Na modulação de emenda em processo de *splicing* com PNA, pode ocorrer a inibição ou alteração do *splicing*, com a inclusão ou exclusão de *exon* ou inclusão de *intron*. Consequentemente, do ponto de vista terapêutico, pode impedir certas seleções desfavoráveis no *splicing*, como a exclusão indevida de sequências em pré-RNA de *splicing*, e estimula que o processo ocorra de maneira adequada, gerando proteínas da maneira correta. Enquanto isso, no bloqueio ou na prisão traducional, o PNA é capaz de impedir a transcrição por meio de sua alta afinidade, que gera hibridação superior, que a depender da sequência alvo pode ocasionar um bloqueio ou uma parada traducional. Desse modo, tendo como alvo transcritos mutantes, o PNA pode reduzir, restaurar ou reparar defeitos de expressão proteica, patógenos de certos distúrbios neurodegenerativos, como tem sido bastante aproveitado para atingir genes mutantes de DA, ELA, doença de Huntington em estudos (MACLELLAND; KRAVITZ; GUPTA, 2023; MONTAZERSAHEB; HEJAZI; CHAROUDEH, 2018).

Os ASO funcionam para alterar o *splicing* de diversos genes vinculados a distúrbios neurodegenerativos (como DA, ELA e doença de Huntington), regulando a expressão de componentes com tau,  $\beta$ -globina, IL-5R, bcl-x, distrofina e c-myc (MONTAZERSAHEB; HEJAZI;

CHAROUDEH, 2018). No entanto, embora já haja dados sólidos obtidos de estudos pré-clínicos, os meios de administração de PNA ainda apresentam desafios diante do atingimento do SNC, como é o caso da barreira hematoencefálica, que impede a entrada da maioria das moléculas vindas da circulação periférica. Desse modo, deve-se considerar outras técnicas de administração, podendo-se ter em mente opções como intracerebroventricular, intratecal ou intranasal (MACLELLAND; KRAVITZ; GUPTA, 2023).

### 3.5 Influência do Intervalo *Post-Mortem* (IPM) no Transcriptoma

Tratando-se de tecidos submetidos a um intervalo *post-mortem* (IPM), a compreensão das alterações que o IPM pode desencadear nas amostras se faz crucial para o alcance de resultados verídicos, assim como para a busca de meios de prolongar sua estabilidade. As avaliações das mudanças que ocorrem nos tecidos em IPM podem ser categorizadas das seguintes formas: propriedades funcionais, morfológicas e biomoleculares. Enquanto as propriedades funcionais tratam-se da fisiologia e da funcionalidade celular, as morfológicas podem ser tanto macroscópicas, como a tendência do tecido cerebral se liquefazer ao longo do tempo, quanto microscópicas, onde se encaixa a morfologia da membrana celular (morfometria). Já as propriedades biomoleculares abrangem a análise de diversas classes biomoleculares, como proteínas, lipídios e RNAs, avaliando também seus tipos específicos e suas propriedades (KRASSNER et al., 2023).

É importante ressaltar que diferente do DNA, que apresenta uma estrutura relativamente estável, o RNA trata-se de um material bastante instável, sendo facilmente degradado. No entanto, considerando as mudanças ambientais ao qual o organismo é submetido em IPM (por exemplo, mudanças de temperatura, de pH, da presença de oxigênio e de hidratação), há um grande risco de perda desse material, inclusive, associada à isquemia decorrente da morte. Sabe-se que após a morte ocorre uma sequência de ações degradativas causadas por ribonucleases (RNases) e bactérias, além das interferências ambientais. Estudos já esclareceram que amostras de sangue retirado de cadáveres, aproximadamente 20 horas após a morte, tornam-se ácidas (pH de 7,0 a 5,5). Também já foi observado que mRNAs permanecem conservados em cadáveres mumificados em decorrência de sua desidratação, bem como ocorre em amostras de sangue seco. Contudo, já foi comprovado que, em armazenamento adequado, o RNA é capaz de se manter intacto por uma quantidade considerável de tempo (JAVAN et al., 2024; SOBUE et al., 2016).

As taxas de degradação dos transcritos dependem também dos tipos de tecidos em que ocorrem, com interferência das expressões geradas de interações genéticas combinadas. Entretanto, outros fatores que podem influenciar nos resultados observados com a análise do transcriptoma são as condições metabólicas e patologias pré-morte, muitas das quais podem ser avaliadas e descobertas em autópsia. Esse é o caso de doenças neurodegenerativas, por exemplo, que tem a avaliação neuropatológica em autópsia como padrão ouro. Desse modo, as análises moleculares dos transcritos de mRNA, bem como de suas bases genéticas, na chamada autópsia molecular, possibilitam a pesquisa de diversos distúrbios apresentados pelo indivíduo em vida, de modo a, inclusive, contribuir para a investigação das causas da morte. Apesar de sua susceptibilidade a se deteriorar, com variabilidade de minutos a semanas com influência de indução genética, já foi observada considerável resistência das estruturas de mRNA em IPM superiores a 48 horas. Contudo, o mais adequado é ter as espécimes armazenadas e transportadas em um IPM inferior a 48

horas e temperatura ideal de 4 °C (DUGGER; DICKSON, 2017; JAVAN et al., 2024; SCOTT et al., 2020).

Ainda, assim como o transcriptoma, o tanatotranscriptoma de mRNA também possui perfil único referente aos padrões de expressão de seu tecido, de modo que é possível identificar seu órgão de origem por meio de análises moleculares. Estudos que investigam os padrões genéticos de processos relacionados à apoptose já relataram que a expressão do gene anti-apoptótico da proteína inibidora de apoptose ligada ao cromossomo X (XIAP) foi superior a 28 vezes em IPM de 48 horas. Nesse sentido, os mRNAs têm sido um recurso notável de diversos estudos que buscam compreender os mecanismos associados à morte. Foi identificado que no período de tempo em que as células do organismo permanecem vivas mesmo após a morte do corpo ocorre a retirada da cauda poli(A) 3', ou deadenilação que desencadeia a degradação de mRNA no citoplasma e a variação da meia-vida de mRNAs específicos (SCOTT et al., 2020).

Em uma pesquisa realizada, comparando a expressão gênica em amostras de tecidos cerebrais frescos e em IPM, foi elucidado que dentro de poucas horas em período *post-mortem*, o número de transcritos dependentes da atividade neuronal sofreu acelerada redução, com uma preservação relativa dos genes de manutenção (muito utilizados como modelo para a normalização do RNA). No entanto, enquanto ocorria perda de genes, foi observado um aumento mútuo da expressão gênica astrogliar e microglial por até um período de cerca de 24 horas, destacando alterações transcricionais e celulares altamente dinâmicas no intervalo *post-mortem*. Assim, foi enfatizada a possível interferência que essas alterações podem causar na interpretação de estudos em tecido cerebral humano *post-mortem*, especialmente se direcionados ao genoma ou a mecanismos neurais e gliais (DACHET et al., 2021).

Diversas dúvidas sobre a continuidade da atividade genética após a morte e o tanatotranscriptoma já foram ressaltadas dentro do campo da ciência, o que instiga a realização de pesquisas. As células possuem respostas genéticas a situações de evolução de perda funcional crítica, em um mecanismo de luta pela sobrevivência. Nesse processo ocorrem alterações das atividades transcricionais, com o consequente estímulo das vias de desenvolvimento relacionadas a sinalização PI3K-Akt, associadas a proteína quinase B (PKB ou Akt), reguladora de diversos sistemas vitais para a célula, como crescimento, metabolismo e proliferação (DACHET et al., 2021; JAVAN et al., 2024).

Um outro estudo, realizado em cérebro de camundongos, alcançou resultados que fortalecem a confiança na detecção de RNA em seções de hipocampo, mais especificamente o RNA de proteínas receptoras específicas da microglia se mantém. Esse artigo resalta a detecção confiável de RNAs expressos a partir de genes com atividade transcricional baixa e alta (Polr2a, PPIB e UBC). Isso foi possibilitado com a remoção do cérebro seguida de processamento em seções de parafina e armazenamento em temperatura ambiente (21 °C). O experimento demonstrou, inclusive, fidelidade em um atraso de até 48 horas para a remoção de tecido, havendo redução de sinais apenas em atrasos excedentes a 48 horas. Já as seções de tecido das amostras possibilitam a detecção de RNA específico em caso de amostragem dentro de 24 horas. Além disso, foi observado também que poderia haver chances de perda dos sinais de RNA em caso de armazenamento dos cadáveres a 4 °C. (SEIFFER et al., 2024).

Ainda, uma pesquisa envolvendo o transcriptoma humano confirma haver estabilidade nas assinaturas das amostras utilizadas quando comparada com tecido *in vivo*, observando que a isquemia em IPM não gerou tanta interferência nas assinaturas

transcricionais das amostras (MELÉ et al., 2015). Ademais, já foram desenvolvidos métodos de medida de integridade de RNA confiáveis, que servem de neutralização dos efeitos degradativos do RNA, como o chamado *transcript integrity number* (TIN), em inglês, que se traduz como “número de integridade da transcrição”. Essa medida busca minimizar casos de falso positivo (WANG et al., 2016).

### 3.6 Explorando as Possíveis Aplicações dos Conhecimentos Adquiridos

Haja vista que a disponibilidade de registros científicos transcriptômicos vem se ampliando gradualmente, junto à diminuição dos custos de RNAseq para suas análises, é previsto que as avaliações dos transcritos de RNA possam servir de auxílio em investigações referentes ao quadro de pacientes (FUTSCHIK et al., 2020). A partir da compreensão do transcriptoma e do modo como várias das doenças neurodegenerativas mais incidentes se associam a erros no *splicing*, pesquisas voltadas a alternativas terapêuticas deram novas expectativas diante dessas neuropatologias. Observa-se, por exemplo, como o oligonucleotídeo antisense (ASO) de comutação de *splicing* proporciona um efeito redutor e restaurador da expressão de mRNAs e, logo, de suas traduções proteicas (LI et al., 2021).

Desse modo, os conhecimentos obtidos exercem um papel fundamental na evolução e discussão de tratamentos, como mecanismos capazes de alterar funcionalmente o RNA do sistema nervoso em casos de distúrbios neurodegenerativos, onde se tem como exemplo os mecanismos de oligonucleotídeos antisense. A partir das regiões específicas de RNA, a biologia molecular possibilitou o desenvolvimento de análogos sintéticos, baseados em oligonucleotídeos, sendo capazes de se ligarem às regiões de ácido nucleico às quais foram projetados (EVERS; TOONEN; ROON-MOM, 2015; MACLELLAND; KRAVITZ; GUPTA, 2023).

Sabe-se que a morte está vinculada a processos degradativos graduais, com transformações estruturais e organizacionais moleculares associadas aos transcritos de RNA, capazes de interferir nas interpretações de suas amostras quando comparado com seu organismo em vida. Com base nisso, é de extrema importância que os pesquisadores entendam esses processos, para que possam se adaptar e utilizar os materiais disponíveis a seu favor, especialmente, relacionados às condições fisiológicas e patológicas *antemortem*. Vê-se como exemplo as mudanças em mRNAs, relacionados à sobrevivência de um indivíduo (POZHITKOV et al., 2017). As amostras biológicas são fontes primordiais de informações. Contudo, se tratando de estruturas tão facilmente degradáveis como RNA, sua leitura nas amostras pode ser distorcida e interferir nas análises de suas respectivas expressões genéticas (WANG et al., 2016).

## 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos dos mecanismos biológicos se baseiam em uma gama extremamente extensa e complexa de elementos, que exigem processos e abordagens trabalhosos para sua maior produtividade. Contudo, os esforços requeridos nessas pesquisas se fazem cruciais para sua compreensão, de modo a colaborar com descobertas adjacentes ou indiretamente relacionadas. Sabe-se que tecidos cerebrais frescos são escassos, então são utilizadas amostras em IPM para estudos focados na atividade transcricional de doenças neurodegenerativas. Portanto, fica nítida a importância de um conhecimento mais

aprofundado dos mecanismos vinculados à morte. Até então, mesmo que possa haver interferência de múltiplos fatores no transcriptoma *post-mortem*, já foram documentados meios confiáveis de evitar a perda de transcritos ocasionada pela degradação, colaborando para a fidelidade das leituras. Esses meios englobam métodos adequados de coleta, armazenamento e extração, além, é claro, da análise e interpretação. No entanto, ainda há diversas barreiras que dificultam a obtenção das amostras de tecidos *post-mortem*, como questões éticas e legais.

Ainda, é aparente que as pesquisas já realizadas com esse material, até então, alcançaram resultados extremamente produtivos. Observando o amplo campo de isoformas de transcritos que já foram descobertos se associarem às doenças neurodegenerativas, tem-se um parâmetro um pouco melhor da complexidade de sua patogênese, ainda que muito ainda permaneça obscuro. O desenvolvimento de alternativas terapêuticas, em especial as que se baseiam em alteração de *splicing* (como é o caso de ASO) progride com base nos conhecimentos adquiridos de estudos de perfil transcriptômico, muitos dos quais são realizados em amostras *post-mortem*. É essa cooperação científica que possibilita a especificidade dos ASOs para as sequências do RNA alvo, auxiliando no processo adequado e eficiente de sua elaboração. Desse modo, os avanços proporcionam grandes expectativas para o futuro terapêutico de distúrbios neurodegenerativos.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

AGNELLO, L.; CIACCIO, M. Neurodegenerative Diseases: From Molecular Basis to Therapy. **International Journal of Molecular Sciences**. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36361643/>>. Acesso em: 30 de mar. de 2024.

DACHET, F et al. Selective time-dependent changes in activity and cell-specific gene expression in human postmortem brain. **Scientific Reports**. 2021. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7988150/>>. Acesso em: 19 de mar. de 2024.

DAVIS, A. A; LEYNS, C. E; HOLTZMAN, D. M. Intercellular Spread of Protein Aggregates in Neurodegenerative Disease. **Annu Rev Cell Dev Biol**. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6350082/>>. Acesso em: 20 de abr. de 2024.

DUGGER, B. N.; DICKSON, D. W. Pathology of Neurodegenerative Diseases. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28062563/>>. Acesso em: 30 de mar. de 2024.

ERKKINEN, M. G.; KIM, M. O.; GESCHWIND, M. D. Clinical Neurology and Epidemiology of the Major Neurodegenerative Diseases; **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**; 2018; Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5880171/>>. Acesso em: 31 de mar. de 2024.

EVERS, M. M.; TOONEN, L. J.; ROON-MOM, W. M. Antisense oligonucleotides in therapy for neurodegenerative disorders. **Advanced drug delivery reviews**. 2015. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X15000435?via%3Dihub>>. Acesso em: 04 de jun. de 2024.

FUTSCHIK, M. E. et al. The human transcriptome: implications for understanding, diagnosing, and treating human disease. **Essential Concepts in Molecular Pathology**. 2. ed. Academic Press. 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780128132579000073>>. Acesso em: 14 de mai. de 2024.

GIUSTI, S. A. et al. A brain-enriched circular RNA controls excitatory neurotransmission and restricts sensitivity to aversive stimuli. **Science advances**. 2024. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38787942/>>. Acesso em 24 de mai. de 2024.

JAVAN, G. T. et al. Complexity of human death: its physiological, transcriptomic, and microbiological implications. **Frontiers Microbiology**. 2024. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10822681/>> Acesso em: 29 de abr. de 2024.

KRASSNER, M. M. et al. Postmortem changes in brain cell structure: a review. *Free Neuropathology*. 2023. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10294569/>>. Acesso em: 05 de mai. de 2024.

LI, D. et al. Neurodegenerative diseases: a hotbed for splicing defects and the potential therapies. **Translational neurodegeneration**. 2021. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8136212/>>. Acesso em 30 de mai. de 2024.

LOGROSCINO, G.; URSO, D.; SAVICA, R. Descriptive Epidemiology of Neurodegenerative Diseases: What Are the Critical Questions?. **Karger Author's Choice**. 2022. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9677839/>>. Acesso em 14 de abr. de 2024.

LOPES, K. P. et al. Genetic analysis of the human microglial transcriptome across brain regions, aging and disease pathologies. **Nature genetics**. 2022. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9245609/>>. Acesso em: 06 de jun. de 2024.

MACLELLAND, V.; KRAVITZ, M.; GUPTA, A. Therapeutic and diagnostic applications of antisense peptide nucleic acids. **Molecular therapy**. 2023. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10777018/>>. Acesso em 04 de jun. de 2023.

MELÉ, M. et al. Human genomics. The human transcriptome across tissues and individuals. **Science**. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4547472/>>. Acesso em: 10 de mai. de 2024.

MONTALBANO, M. et al. Pathological tau signatures and nuclear alterations in neurons, astrocytes and microglia in Alzheimer's disease, progressive supranuclear palsy, and dementia with Lewy bodies. **Brain Pathology**. 2023. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9836371/>>. Acesso em: 20 de abr. de 2024.

MONTAZERSAHEB, S.; HEJAZI, M. S.; CHAROUDEH, H. N. Potential of Peptide Nucleic Acids in Future Therapeutic Applications. **Advanced pharmaceutical bulletin**. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6311635/>>. Acesso em 04 de jun. de 2024.

PAIVA, M. M. Identificação de proteínas reguladoras do splicing associadas à microRNAs. 2016. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) - Instituto de Ciências Biomédicas, **Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2016. Disponível em: <<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42134/tde-10112016-101050/pt-br.php>>. Acesso em: 13 de mai. de 2024.

PENG, C; GATHAGAN, R. J; LEE, V. M. Y. Distinct  $\alpha$ -Synuclein strains and implications for heterogeneity among  $\alpha$ -synucleinopathies. **Neurobiol Dis**. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5735026/>>. Acesso em: 20 de abr. de 2024.

POZHITKOV, A. E. et al. Tracing the dynamics of gene transcripts after organismal death. **Open Biology**. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5303275/>>. Acesso em: 05 de mai. de 2024.

QUEMENER, A. M. et al. The powerful world of antisense oligonucleotides: From bench to bedside. **Wiley interdisciplinary reviews**. 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9285911/>>. Acesso em 04 de jun. de 2024.

ROTHER, E. T. Revisão sistemática X revisão narrativa. **Acta Paul Enferm**. 2007. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/ape/a/z7zZ4Z4GwYV6FR7S9FHTByr/>>. Acesso em: 18 de abr. de 2024.

SCOTT, L. et al. Life and death: A systematic comparison of antemortem and postmortem gene expression. **Gene**. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31935499/>>. Acesso em: 21 de mar. de 2024.

SEIFFER, S. et al. Reliable detection of RNA in hippocampus sections of mice by FISH up to a post-mortem delay of 24 h. **Histochemistry and Cell Biology**; 2024. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38582805/>>. Acesso em: 13 de abr. de 2024.

SOBUE, S et al. Characterization of gene expression profiling of mouse tissues obtained during the postmortem interval. **Experimental and molecular pathology**. 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0014480016300648?via%3Dihub>>. Acesso em: 15 de mai. de 2024.

SOUSA, R. M. Inflammation and late-onset alzheimer's disease : a case-control association study = Inflamação e doença de Alzheimer esporádica : um estudo de associação. **Universidade Federal do Paraná**. 2017. Disponível em: <[https://btd.ibict.br/vufind/Record/UFPR\\_f1e688fe481eca901d6eb116fe1df881](https://btd.ibict.br/vufind/Record/UFPR_f1e688fe481eca901d6eb116fe1df881)>. Acesso em: 13 de abr. de 2024.

VAQUERO-GARCIA, J. et al. RNA splicing analysis using heterogeneous and large RNA-seq datasets. **Nature communications**. 2023. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9984406/>>. Acesso em 27 de mai. de 2024.

WANG, L et al. Measure transcript integrity using RNA-seq data. **BMC bioinformatics**. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4739097/>>. Acesso em 30 de mai. de 2024.

WANG, Z; GERSTEIN, M; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews. Genetics*, v. 10, n. 1, p. 57-63, 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19015660/>>. Acesso em: 17 de mai. de 2024.

## AGRADECIMENTOS

Com o trabalho pronto, olhando brevemente para trás, vejo tantos momentos de ansiedade, desesperança e sobrecarga, e é motivo suficiente para me fazer suspirar, mas também fico feliz em dizer que vejo aqueles momentos de alívio e esperança, principalmente com todos que me apoiaram. Gostaria primeiramente de agradecer à minha família, sempre me apoiando e se preocupando com minha saúde física e mental quando eu estava disposta a sacrificá-la de pouquinho em pouquinho pela vida acadêmica, agradeço do fundo do meu coração por sempre cuidarem de mim e me apoiarem nessa jornada, sempre assistindo e torcendo dos bastidores. Claro, agradeço aos meus amigos, que não pensaram duas vezes antes de escolherem me apoiar, me escutando e me ajudando a me acalmar nas horas de instabilidade, arrancando risadas sinceras quando eu mais precisava. Agora, eu gostaria de agradecer aos meus professores e ao meu orientador, que me guiou quando eu estava mais desorientada, me ajudando a criar a confiança necessária para seguir adiante. Obrigada do fundo do meu coração a todos os que me acompanharam, pai, mãe, irmão, família, amigos e professores, obrigada por serem peças fundamentais na minha vida e evolução, tanto pessoal quanto profissional!