

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAMILLE YAGUTI BOHNEN

EIXO INTESTINO-CÉREBRO NA DOENÇA DE ALZHEIMER:
ESTUDO DE EXPRESSÃO DOS GENES *Camk1d* E *Slc25a5* EM
TECIDOS CEREBRAIS E COLÔNICOS EM MODELO ANIMAL

CURITIBA

2024

CAMILLE YAGUTI BOHNEN

**EIXO INTESTINO-CÉREBRO NA DOENÇA DE ALZHEIMER:
ESTUDO DE EXPRESSÃO DOS GENES *Camk1d* E *Slc25a5* EM
TECIDOS CEREBRAIS E COLÔNICOS EM MODELO ANIMAL**

Projeto de pesquisa apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof Dr. Ricardo Lehtonen
Rodrigues de Souza

Co-orientadora: Isadora de Lourdes
Signorini Souza

CURITIBA

2024

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me mantido nessa jornada com saúde e condições para chegar até o final.

Agradeço à minha mãe Mirian K. Yaguti e meu pai Wilson Bohnen, por todo o esforço investido na minha educação, e pelo apoio e incentivo que serviram de alicerce para as minhas realizações.

Sou grata pela confiança depositada na minha proposta de projeto, pelo meu professor orientador Dr. Ricardo Lehtonen, e coorientadora Isadora L. Signorini Souza. As suas valiosas indicações fizeram toda a diferença.

Agradeço ao meu namorado, Jonathan A. Back, que sempre esteve ao meu lado me apoiando durante o percurso acadêmico.

Aos meus amigos do curso de graduação, e do Laboratório de Polimorfismos, que compartilharam dos inúmeros desafios que enfrentamos, sempre com espírito colaborativo.

Às minhas amigas da vida, que deixaram tudo mais leve, e fizeram eu me sentir acolhida nos momentos mais desafiadores.

Também quero agradecer à Universidade Federal do Paraná, e a todos os professores do meu curso pela elevada qualidade do ensino oferecido.

“Tudo o que vivemos está guardado em nossas memórias,
mas quando a memória falhar, como lembraremos de nós?”

O que somos uns para os outros está em nossas almas,
então, quando não pudermos mais lembrar,
sentiremos, pois sentir é eterno.”

Rosane Brito

RESUMO

A Doença de Alzheimer (DA) é a forma mais prevalente de demência na população idosa, correspondendo a cerca de 60% dos casos de neurodegeneração acima dos 65 anos de idade. Trata-se de uma condição progressiva, que prejudica as funções cognitivas, sendo a memória a mais afetada. O diagnóstico é majoritariamente clínico e tardio, e os tratamentos disponíveis apenas amenizam os sintomas, sem impedir a progressão da doença. Estudos recentes sugerem uma interação sistêmica entre o sistema nervoso central (SNC) e o sistema nervoso entérico (SNE), com implicações para a progressão da DA, embora os mecanismos dessa relação ainda sejam pouco compreendidos. A presente pesquisa teve como objetivo investigar a expressão dos genes *Camk1d* e *Slc25a5*, previamente identificados no mesmo laboratório de pesquisa, como diferencialmente expressos em análises proteômicas de amostras cerebrais de modelos animais de DA, em comparação com amostras de animais controle, sem indução à DA. Esses genes desempenham papéis fundamentais na homeostase do cálcio e transporte mitocondrial de ATP; processos críticos para a neurotransmissão, plasticidade sináptica e metabolismo celular. Para estudar a relevância desses genes no eixo intestino-cérebro, foram analisadas amostras de cólon, córtex e hipocampo; de *Rattus norvegicus* modelo de Alzheimer utilizando RT-qPCR. Os dados foram processados no *software* R, com cálculos de expressão relativa pelo método $2^{(-\Delta\Delta CT)}$. Os resultados revelaram uma superexpressão significativa do gene *Slc25a5* nas amostras de hipocampo e córtex, sugerindo maior demanda energética em resposta a danos neuronais e processos de astrogliose associados à DA. Em contrapartida, o gene *Camk1d* apresentou redução expressiva no cólon, corroborando dados que associam sua baixa expressão à disfunção neuronal e à formação de emaranhados neurofibrilares. Esses achados indicam uma relação potencial entre a expressão diferencial destes genes, e os mecanismos neurodegenerativos característicos da DA, sugerindo que a regulação do metabolismo energético, do equilíbrio redox, e da homeostase do cálcio desempenham papéis cruciais na manutenção da integridade neuronal e na compreensão das interações entre o SNC e o SNE na DA. Contudo, por se tratar de uma condição complexa e multifatorial, são necessárias mais pesquisas com essa abordagem integrada, para aprofundar o entendimento das interações entre esses sistemas na DA, reforçando a relevância do eixo intestino-cérebro como alvo potencial para investigações futuras e intervenções terapêuticas.

Palavras-chave: Neurodegeneração. Eixo intestino-cérebro. Expressão gênica. Homeostase do Cálcio.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da comunicação bidirecional entre o eixo intestino-cérebro-microbiota	09
Figura 2 - RPKM de <i>SLC25A5</i> em diferentes tecidos humanos	10
Figura 3 - RPKM de <i>CAMK1D</i> em diferentes tecidos humanos	11
Figura 4 - Árvore filogenética das diferentes proteínas formadas pelos genes <i>SLC25A4</i> , <i>SLC25A5</i> e <i>SLC25A6</i>	12
Figura 5 - Diagrama de interação gênica de processos biológicos associados ao gene <i>CAMK1D</i> segundo a gene ontology	25
Figura 6 - Gráfico de barras de processos biológicos associados ao gene <i>CAMK1D</i> segundo a gene ontology - com os valores de p	26
Figura 7 - Quantificação relativa do gene <i>Slc25a5</i> no córtex de ratos do grupo controle (SHAM) vs. ratos do grupo alzheimer (STZ).....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média da quantidade de RNA extraído das amostras, e seus respectivos valores de pureza e contaminação	22
Tabela 2 - Sequência dos primers usados nas reações de qPCR	23
Tabela 3 - Vias biológicas enriquecidas para os genes <i>SLC25A5</i> e <i>CAMK1D</i> na Doença de Alzheimer ($p \leq 0,05$)	27
Tabela 4 - Resultados do teste de shapiro-wilk	30
Tabela 5 - RQ médio, FC e p dos grupos SHAM e STZ nas amostras de hipocampo, córtex e cólon para os genes <i>Slc25a5</i> e <i>Camk1d</i>	32

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1 DOENÇA DE ALZHEIMER E EPIDEMIOLOGIA	03
2.1.1 Patogênese	05
2.1.2 Diagnóstico e Tratamento	06
2.2 EIXO INTESTINO-CÉREBRO E NEURODEGENERAÇÃO	07
2.3 EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL NA DA	09
2.3.1 <i>SLC25A5</i> e Doença de Alzheimer.....	11
2.3.2 <i>CAMK1D</i> e Doença de Alzheimer	13
2.3.3 Técnicas para análise de expressão gênica	14
2.4 MODELO ANIMAL	15
3 JUSTIFICATIVA	17
4 OBJETIVOS	19
4.1 Geral	19
4.2 Específicos	19
5 MATERIAIS E MÉTODOS	20
5.1 ANÁLISE DE VIAS ENRIQUECIDAS	20
5.2 AMOSTRAS	21
5.3 EXTRAÇÃO DE RNA.....	21
5.4 RETROTRANSCRIÇÃO	22
5.5 qPCR	22
5.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA	24
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
6.1 ANÁLISE DE VIAS ENRIQUECIDAS	25
6.1 RT-qPCR	29
6.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA	30
6 CONCLUSÕES	37
REFERÊNCIAS	38
APÊNDICE 1 - ANÁLISE ORA	42
APÊNDICE 2 - ANÁLISE DE RQ E FC	50
APÊNDICE 3 - VALORES DE Ct OBTIDOS	53

1 INTRODUÇÃO

A Doença de Alzheimer (DA) é uma condição neurodegenerativa progressiva e a forma mais prevalente de demência em idosos acima de 65 anos (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2023). Clinicamente, a DA é caracterizada por perda de memória, dificuldades em realizar atividades cotidianas, desorientação temporal e espacial, oscilações de humor e distúrbios alimentares (KIM; NOH; KIM, 2021). Essa patologia afeta cerca de 55 milhões de indivíduos em todo o mundo, com projeções alarmantes de alcançar 139 milhões até 2050, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS; 2023), salientando-se como uma crescente preocupação global.

Seu mecanismo patológico se caracteriza por alterações neurodegenerativas, incluindo o acúmulo de placas de β -amiloide ($A\beta$) e emaranhados neurofibrilares (p-TAU) (SCHELTENS et al., 2021). Embora a patogênese da DA seja amplamente estudada, os mecanismos exatos que levam à neurodegeneração ainda não estão completamente elucidados. Nos últimos anos, tem-se atribuído maior atenção ao papel do eixo intestino-cérebro (EIC) na modulação de processos neuro inflamatórios e metabólicos, evidenciando uma comunicação bidirecional entre o sistema nervoso central (SNC) e o sistema nervoso entérico (SNE), que podem se relacionar a DA (ZANETTI et al, 2024).

Adicionalmente, avanços nas investigações genéticas relacionadas à DA têm revelado associações entre a expressão de diversos genes e o prognóstico da doença, evidenciando a importância de fatores genéticos nesse contexto (NIKOLAC PERKOVIC et al., 2021). Em pesquisa anterior realizada no laboratório do atual trabalho, foi realizada uma análise proteômica de amostras cerebrais de ratos modelos de Alzheimer, sendo identificadas proteínas diferencialmente abundantes em relação ao grupo sem a doença. Entre os genes encontrados, que estão relacionados a essas proteínas, destaca-se a expressão diferencial de *Camk1d* e *Slc25a5* (DA SILVA et al., 2024). Tais genes foram documentados no banco de dados BioProject da NCBI, demonstrando que podem exibir expressão significativamente elevada nos tecidos cerebrais, e no cólon de humanos sem alterações patológicas, o que sugere um papel funcional relevante no eixo intestino-cérebro. (“HPA RNA-seq normal tissues (ID 231263) - BioProject - NCBI”, 2014).

As funções de *CAMK1D* e *SLC25A* estão relacionadas a vias metabólicas cruciais, como a regulação do cálcio e a produção de energia, processos fundamentais para a neuroplasticidade, a neurotransmissão e a manutenção da homeostase celular. Alterações na expressão desses genes têm sido associadas a distúrbios metabólicos, inflamação e perda da integridade neuronal, fatores críticos na progressão da DA. (KONG et al., 2024; DA SILVA et al., 2024; CLÉMENÇON et al., 2013).

No entanto, a relação entre a expressão gênica no SNC e no SNE, bem como o papel desempenhado por esses genes na patogênese da DA, permanecem insuficientemente compreendidos (NOTT; HOLTMAN, 2023), ressaltando a necessidade de investigações que abordem essa interconexão de forma integrativa. Neste contexto, o presente trabalho se propõe analisar a expressão gênica dos genes *Camk1d* e *Slc25a5* em amostras de hipocampo, córtex e cólon de *Rattus norvegicus* Wistar machos com modelo de Alzheimer, utilizando a técnica de RT-qPCR, considerada padrão ouro para expressão gênica. A experimentação animal, nesse cenário, apresenta-se como uma abordagem fisiologicamente robusta para investigar hipóteses de maneira controlada e detalhada (PELLEGRINI; 2020). Espera-se que os resultados contribuam para o entendimento dos mecanismos moleculares centrais e periféricos subjacentes à patologia, além de abrir caminhos para o desenvolvimento de novas abordagens diagnósticas e terapêuticas que integrem a visão sistêmica da DA.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DOENÇA DE ALZHEIMER E EPIDEMIOLOGIA

A doença de Alzheimer (DA) é a causa de demência mais comum entre os idosos com prevalência acima de 65 anos, representando 60% a 80% dos casos dentro deste grupo. (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2023). As primeiras regiões do cérebro a serem afetadas na DA incluem o hipocampo e o córtex entorrinal, regiões próximas entre si e cruciais para a formação de novas memórias, especialmente as chamadas "memórias episódicas". Com a progressão da doença, outras habilidades cognitivas, como atenção, linguagem, navegação espacial, e a capacidade de realizar tarefas complexas, também sofrem declínio, culminando eventualmente na perda total da funcionalidade do paciente. Esse padrão de comprometimento cognitivo pode diferenciar a DA de outras demências, como a demência frontotemporal por exemplo, que em estágios iniciais, tende a afetar prioritariamente os lobos frontal e temporal, resultando em alterações comportamentais e de linguagem antes de impactar significativamente a memória (KIM; NOH; KIM, 2021).

A DA pode ser classificada em duas categorias principais: Alzheimer de início tardio (LOAD) e Alzheimer de início precoce (EOAD), as quais são distintas principalmente pela idade de início das manifestações patológicas. A LOAD é a forma mais comum, representando de 90% a 95% dos casos, ela é diagnosticada após os 65 anos, e caracteriza-se pela perda de memória episódica. Em contraste, a EOAD é menos comum, afetando indivíduos geralmente antes dos 65 anos. Esse tipo tem maior associação a componentes genéticos, demonstrando herdabilidade superior a 90%. Além disso, expõe uma progressão mais acentuada, com maior taxa de atrofia cerebral. (VALDEZ-GAXIOLA et al., 2024).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a DA é a sétima principal causa de morte global e é predominante entre as causas de incapacidade e dependência dos idosos. Em 2020, havia cerca de 1 bilhão de pessoas com mais de 60 anos no mundo, número que deve dobrar até 2050, com dois terços dessas pessoas vivendo em países de baixa ou média renda. Além disso, a população com 80 anos ou mais deve triplicar até 2050, atingindo 426 milhões de pessoas (WHO, 2023). Nesse mesmo contexto, à medida que a população envelhece, o número de

peças com demência no mundo deverá aumentar de 55 milhões em 2019 para 139 milhões em 2050 (WHO, 2023). No Brasil, esse dado contabiliza 1,2 milhão de pessoas que vivem com alguma forma de demência, sendo que 100 mil novos casos são diagnosticados por ano (Ministério da Saúde, 2022).

O estudo multicêntrico *“Duration of preclinical, prodromal, and dementia stages of Alzheimer’s disease in relation to age, sex, and APOE genotype”*, de 2019, traz que para um indivíduo com 70 anos de idade, as estimativas de duração de vida são de 10 anos para o estágio pré-clínico, 4 anos para o estágio prodromático (comprometimento cognitivo leve) e 6 anos para o estágio demencial da doença de Alzheimer, totalizando 20 anos. Ademais, Jack et al. (2019) destacam que os sinais e sintomas clínicos da DA geralmente se manifestam apenas em estágios avançados da patologia. Esse atraso na apresentação clínica contribui para a disparidade observada entre a prevalência e a incidência da patologia. Visto que, aos 85 anos, a prevalência da DA baseada em características biológicas – como alterações estruturais no cérebro, e presença de proteínas patológicas (beta-amiloide e tau hiperfosforilada) – é aproximadamente três vezes maior do que a incidência da doença diagnosticada com base em critérios clínicos. Esse dado sugere que muitos casos permanecem subdiagnosticados, até que os danos cerebrais sejam severos o suficiente para impactar significativamente as funções cognitivas e comportamentais.

Além disso, foi calculado que no ano de 2019, os gastos econômicos globais relacionados às demências foram de 1,3 bilhões de dólares americanos, com aproximadamente 50% desses custos atribuídos aos cuidadores informais (por exemplo, familiares e amigos próximos), e essa contagem pode chegar a US\$ 1,3 trilhão por ano até 2030 (WHO, 2023).

Diante do cenário global desafiador, e considerando que o processo patológico da DA pode ter início até 20 anos antes do surgimento dos sintomas clínicos característicos (ALZHEIMER’S ASSOCIATION, 2024), torna-se evidente a necessidade de avanços no entendimento dessa enfermidade.

2.1.1 Patogênese

A Doença de Alzheimer é considerada uma doença complexa, ainda não totalmente elucidada, se caracteriza pelo acúmulo de peptídeos beta-amiloides ($A\beta$), que formam placas no espaço extracelular, e de proteínas TAU, que formam emaranhados neurofibrilares (NTFs) no espaço intracelular, das células neuronais.

As placas $A\beta$ resultam de uma clivagem errônea da proteína precursora de amilóide (APP) por secretases. Com base no conhecimento atualmente disponível, sabe-se que esse erro na clivagem pode ser resultado de mutações nos genes da APP, da apolipoproteína E (APOE), e nos genes da presenilina 1 (PSEN1) e presenilina 2 (PSEN2), proteínas centrais no complexo gama secretase. As placas formadas prejudicam a comunicação entre os neurônios, e podem iniciar uma resposta inflamatória pela micróglia e astrócitos, evento que leva à liberação de citocinas e neurodegeneração (SCHELTENS et al., 2021).

As proteínas TAU, são proteínas neuronais microtubulares, que estão envolvidas com a integridade do citoesqueleto. Tais proteínas possuem um sítio de ligação regulado pela fosforilação de diversas quinases, as quais podem ser desreguladas devido a presença de $A\beta$, o que leva a uma hiperfosforilação e diminuição da afinidade dessas proteínas com os microtúbulos do citoesqueleto. Assim, o acúmulo das proteínas TAU no citosol leva à formação de emaranhados neurofibrilares que afetam os mecanismos celulares (SCHELTENS et al., 2021).

Portanto, as teorias mais aceitas acerca da patologia do Alzheimer envolvem o acúmulo de $A\beta$ e tau, que implicam em mecanismos neurodegenerativos, acumulando-se no cérebro e contribuindo para a disfunção da plasticidade sináptica e a morte neuronal. Embora as hipóteses centradas no acúmulo dessas proteínas sejam amplamente aceitas, a DA é reconhecida como uma patologia multifatorial que pode abranger fatores como a disfunção do sistema colinérgico, inflamação crônica, desregulação da microbiota intestinal, estresse oxidativo, entre outros. A interação dessas diversas vias em relação a DA tem sido estudada, revelando uma complexidade entre componentes genéticos, epigenéticos e ambientais na etiologia da doença (KHAN; BARVE; KUMAR, 2020). Esses múltiplos fatores destacam a necessidade de abordagens integradas, para compreender os mecanismos subjacentes e identificar intervenções terapêuticas eficazes.

2.1.2 Diagnóstico e Tratamento

Atualmente o diagnóstico da DA é baseado principalmente na identificação de sinais e sintomas clínicos característicos. Todavia, sabe-se que os sintomas na DA são tardios em comparação com o início da patogênese (JACK et al., 2019).

No ambiente de pesquisa, têm-se o uso do PET (*positron emission tomography*) para detecção de placas amiloides no encéfalo, e do LCR (líquido cefalorraquidiano) para confirmação pela análise de proteínas TAU fosforiladas, as quais após serem vastamente depositadas no cérebro, atravessaram a barreira hematoencefálica (JANELIDZE et al., 2020). Apesar de ambos métodos apresentarem alta sensibilidade, especificidade e acurácia - 100% de especificidade e 96% de sensibilidade pelo PET, e 85-90% de acurácia pela análise do LCR (WELLER; BUDSON, 2018) - são exames invasivos, e não acessíveis devido seu alto custo.

Os marcadores genéticos entraram nesse cenário com grande destaque, considerando que o fator de risco genético é o mais forte para o desenvolvimento da DA, sendo que representa de 60% a 80% de herdabilidade para LOAD, e entre 92% e 100% para EOAD (VALDEZ-GAXIOLA et al., 2024). Mais de 160 mutações foram identificadas em três genes cruciais envolvidos na patogênese, mais especificamente na EOAD: o gene da proteína precursora do amiloide (APP) e os genes da presenilina 1 (PSEN1) e presenilina 2 (PSEN2) 3. (NIKOLAC PERKOVIC et al., 2021). Portanto, as mutações genéticas desempenham um papel significativo na predisposição e desenvolvimento da doença de Alzheimer, contribuindo para a compreensão da base genética e sua importância na patogênese.

Os tratamentos existentes para a DA, como os inibidores da colinesterase e antagonistas dos receptores NMDA, proporcionam o alívio sintomático, com eficácia moderada e limitada a longo prazo, e sem, contudo, impedir a progressão do declínio cognitivo (KUMAR VATS et al., 2023). Entre as abordagens terapêuticas emergentes, destaca-se o aducanumabe, um anticorpo monoclonal que tem como alvo as placas amiloides, cuja eficácia permanece controversa devido a evidências clínicas conflitantes. Além disso, intervenções não farmacológicas, como o treinamento cognitivo, mitigam a sintomatologia comportamental porém também não são capazes de impedir eficazmente a progressão da doença (KUMAR VATS et al.,

2023). Assim, a compreensão aprofundada dos mecanismos envolvidos na patogênese torna-se essencial para o desenvolvimento de estratégias diagnósticas mais precoces e condutas terapêuticas mais eficazes, contribuindo para um melhor prognóstico da doença

2.2 EIXO INTESTINO-CÉREBRO E NEURODEGENERAÇÃO

O eixo intestino-cérebro, do inglês “*gut-brain axis*”, refere-se a um sistema bidirecional de comunicação entre o trato gastrointestinal (TGI) e o sistema nervoso central (SNC), mediado por vias neurais, imunológicas e endócrinas. O TGI se estende do esôfago ao ânus, e possui uma estrutura complexa e autônoma, a qual abriga uma densa rede de neurônios motores, neurônios sensoriais e células gliais ao longo de sua parede, formando os plexos mioentérico e submucoso. Essa rede forma o Sistema Nervoso Entérico (SNE), cuja alta densidade neuronal supera a da medula espinhal, motivo pelo qual é frequentemente chamado de “segundo cérebro” (MENEZES, 2024).

Os plexos que compõem o SNE são interconectados com tecidos adjacentes, e apresentam uma notável diversidade química, com a produção de mais de trinta tipos de neurotransmissores e a liberação de hormônios que podem atuar no SNC; relação que está esquematizada na Figura 1. Esses neurotransmissores e hormônios são responsáveis pela modulação de processos como a fome e a ingestão alimentar, os quais se mostram afetados em pacientes com a DA. Além de regular a motilidade gastrointestinal, o SNE desempenha funções essenciais no controle das secreções, na regulação hormonal, na manutenção da permeabilidade intestinal e na ativação do sistema imunológico. O declínio funcional e a redução na densidade celular do SNE, frequentemente estão associados ao envelhecimento, e implicam em diversas desordens gastrointestinais e neurológicas (ZANETTI et al, 2024).

Nesse contexto, diversas pesquisas têm destacado a influência significativa da composição da microbiota intestinal no funcionamento adequado tanto do SNE quanto do SNC. Essa interação ocorre por meio de múltiplas vias bioquímicas e físicas, incluindo a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), moléculas com propriedades anti-inflamatórias, peptídeos e neurotransmissores, entre outros,

cuja síntese e regulação podem ser comprometidas em condições de disbiose, ou seja, desequilíbrio na composição da microbiota (SUMEL ASHIQUE et al., 2024).

Além disso, a disbiose pode aumentar a permeabilidade intestinal, facilitando a translocação de metabólitos microbianos e endotoxinas para a circulação sistêmica. Esse processo eleva o estresse oxidativo e pode promover a agregação de proteínas mal dobradas no SNC, como a A β e a alfa-sinucleína; além de afetar a expressão de receptores, e a disponibilidade de neurotransmissores. (DISTRUTTI et al., 2014). Logo, essas alterações podem contribuir para o desenvolvimento de distúrbios neurológicos, por meio de uma via principalmente aferente.

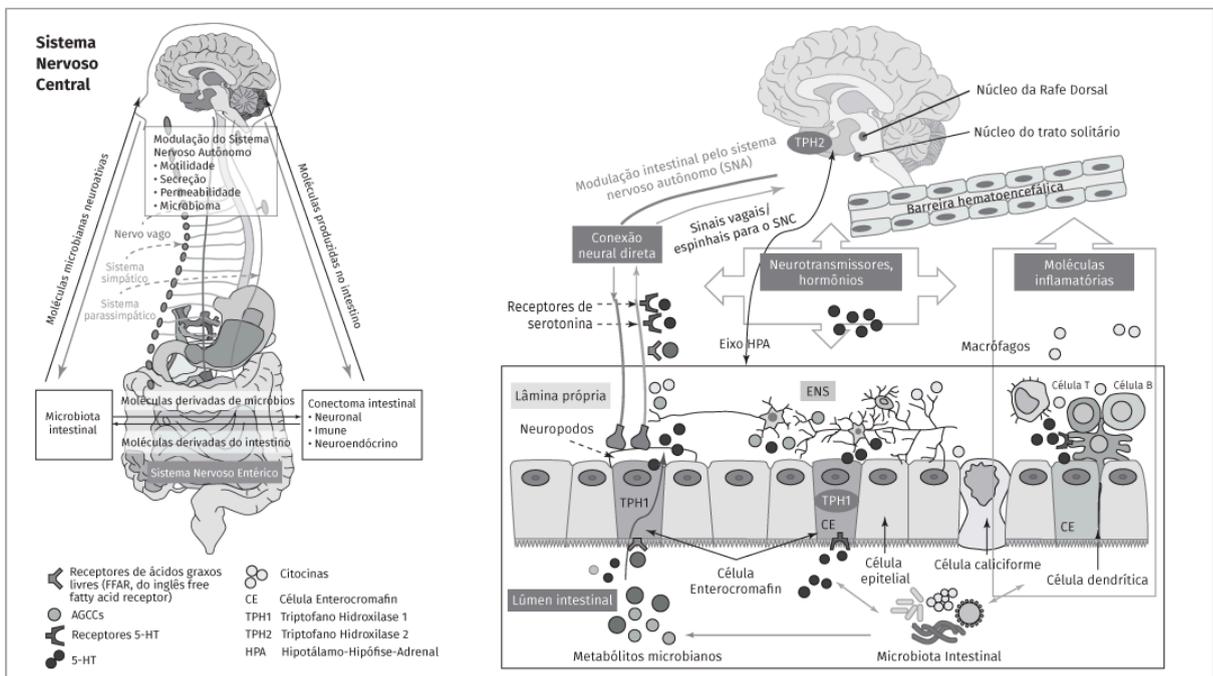
Em um estudo conduzido por Foster et al. (2017) sobre a regulação do eixo intestino-cérebro pelo microbioma, foi observado, utilizando um modelo animal germ-free (isento de microbiota), que houve alterações na expressão de canais iônicos e receptores de neurotransmissores nos neurônios entéricos, e conseqüentemente, na sua excitabilidade e função entre os grupos. Nesse estudo, foram destacadas alterações na morfologia neuronal, na expressão gênica e em receptores associados à neuroplasticidade, ao metabolismo e à resposta ao estresse. Além disso, esses resultados destacam a relevância da experimentação animal como uma abordagem fisiologicamente robusta para investigar hipóteses de maneira controlada e detalhada.

Em estudo de Pellegrini et al. (2020), os pesquisadores revelaram a presença de agregados proteicos (como A β e p-tau) no intestino de camundongos do modelo SAMP8 (Senescence Accelerated Mouse) de Alzheimer, sugerindo que essas deposições podem ocorrer nas fases iniciais da doença, antes do desenvolvimento de sintomas cognitivos. Segundo os autores, o acúmulo desses agregados no trato gastrointestinal não apenas reflete alterações semelhantes observadas no cérebro, mas também indica uma possível interconexão entre a disfunção intestinal e a neurodegeneração. A presença dos agregados proteicos relacionados ao Alzheimer no intestino pode contribuir para a ativação de respostas inflamatórias e neurogênicas, prejudicando a motilidade intestinal e, potencialmente, influenciando a progressão da doença.

Portanto, compreender os mecanismos que conectam o eixo intestino-cérebro às alterações neuropatológicas é essencial para elucidar como os processos periféricos podem modular a expressão gênica em tecidos centrais e periféricos,

ampliando o entendimento sobre a complexa relação entre o TGI e o SNC. Nesse contexto, a experimentação animal se destaca como uma ferramenta saliente, ao reproduzir características neuro inflamatórias e alterações na expressão gênica da DA, possibilitando estudos longitudinais e em ambiente controlado, o que promove avanços que dificilmente seriam alcançados em estudos clínicos iniciais (SUN et al., 2020).

FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA COMUNICAÇÃO BIDIRECIONAL ENTRE O EIXO INTESTINO-CÉREBRO-MICROBIOTA



FONTE: (ZANETTI et al, 2024)

2.3 EXPRESSÃO GÊNICA NA DA

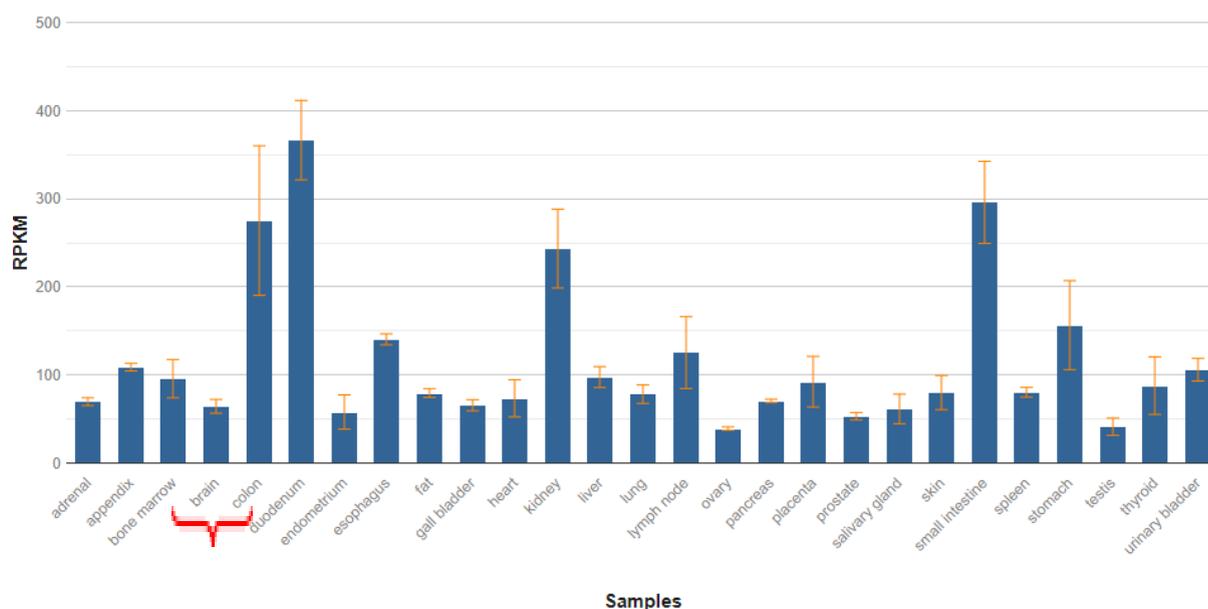
Estudos de expressão gênica fornecem *insights* sobre como as variações genéticas influenciam a biologia celular e os processos patológicos subjacentes à DA. E quando analisam a expressão gênica em diferentes tecidos, mostram que os efeitos regulatórios dos genes associados à DA não se limitam ao cérebro, o que propicia a identificação de novos alvos terapêuticos e a elucidação dos mecanismos biológicos que contribuem para a patologia da doença (GERRING et al., 2020).

Em estudo de análise proteômica com LC-MS/MS (Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massa em Tandem), foi feita a seleção de genes

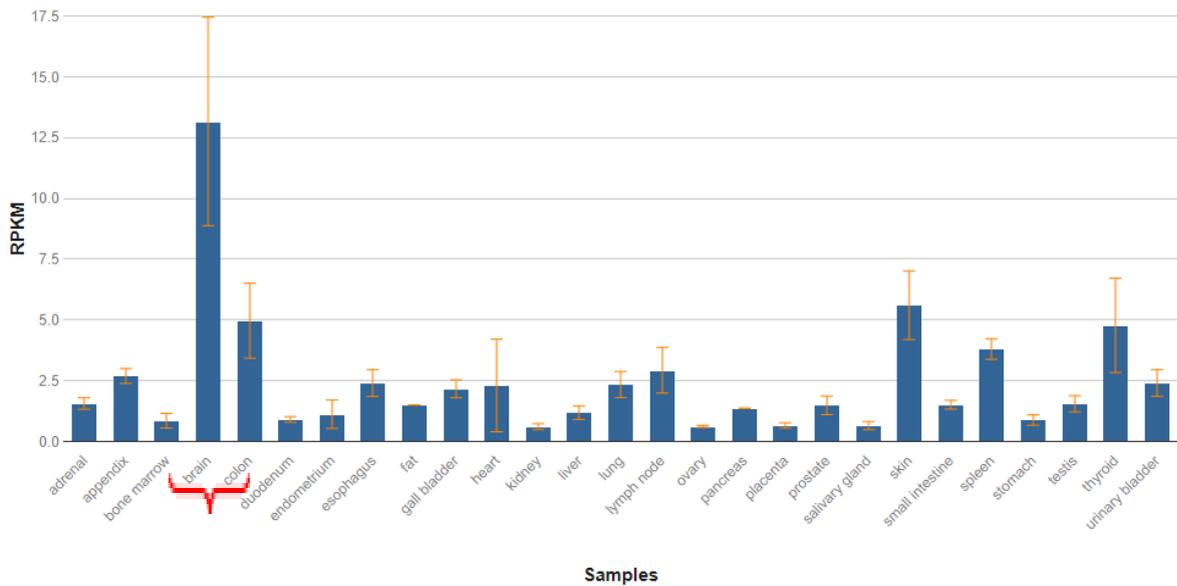
baseada em uma lista de proteínas diferencialmente expressas no córtex pré-frontal e hipocampo em modelo animal da DA, em ratos pelo modelo icv-STZ (injeção cerebroventricular de estreptozotocina). Entre os vários genes que codificam essas proteínas, o *Slc25a5* e *Camk1d* foram selecionados devido à relação entre suas funções proteicas e a DA, demonstrando serem alvos promissores para o entendimento dos mecanismos dessa patologia (DA SILVA et al., 2024).

A análise de dados de expressão gênica, disponibilizados pela plataforma NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), permite identificar níveis e padrões de expressão de genes específicos em diferentes tecidos humanos, por meio de valores de RPKM (*Reads Per Kilobase of transcript per Million mapped reads*). Essas informações são fundamentais para compreender a especificidade tecidual e as possíveis funções biológicas associadas a cada gene. Estudos utilizando dados de RNA-seq de 95 indivíduos humanos sem alterações patológicas (*“HPA RNA-seq normal tissues (ID 231263) - BioProject - NCBI”, 2014*) indicaram que os genes *SLC25A5* e *CAMK1D* apresentam níveis elevados de expressão em tecidos cerebrais e no cólon. Esses achados, ilustrados nas Figuras 2 e 3, destacam uma possível relevância desses genes no contexto do eixo intestino-cérebro, sugerindo potenciais implicações na DA.

FIGURA 2 - RPKM DE *SLC25A5* EM DIFERENTES TECIDOS HUMANOS



FONTE: adaptado de (*“SLC25A5 solute carrier family 25 member 5 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI”, 2024*)

FIGURA 3 - RPKM DE *CAMK1D* EM DIFERENTES TECIDOS HUMANOS

FONTE: adaptado de ("*CAMK1D calcium/calmodulin dependent protein kinase ID [Homo sapiens (human)]*" - Gene - NCBI", 2024)

2.3.1 *SLC25A5* e a Doença de Alzheimer

O gene *SLC25A5* pertence à subfamília de genes de transportadores mitocondriais. Seu produto forma o Ancp, do inglês "*mitochondrial ADP/ATP carrier*", cuja estrutura forma um homodímero embutido na membrana mitocondrial interna. Este transportador é responsável pela translocação de ADP (adenosina difosfato) do citoplasma para a matriz mitocondrial, e de ATP (adenosina trifosfato) da matriz mitocondrial para o citoplasma, desempenhando, assim, um papel fundamental na produção de energia celular, manutenção do potencial elétrico mitocondrial e na prevenção da apoptose. ("*SLC25A5 solute carrier family 25 member 5 [Homo sapiens (human)]*" - Gene - NCBI", 2024).

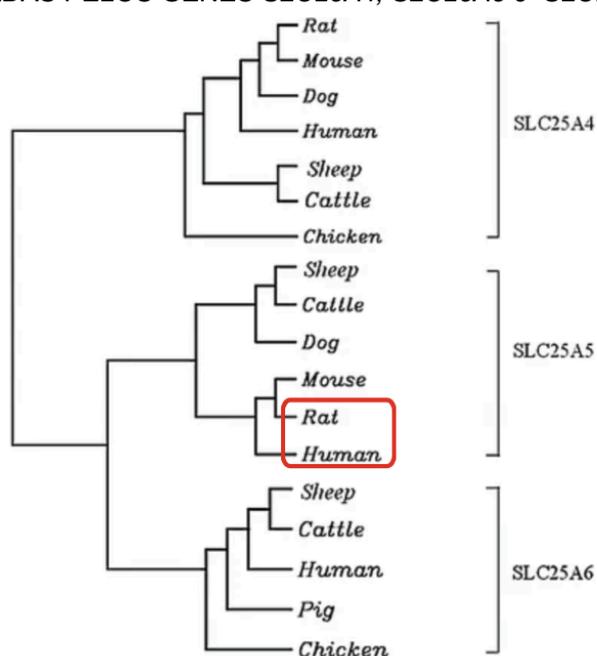
A expressão do *SLC25A5* é altamente regulada, e adaptada à demanda de energia celular tecido específica, sendo mais expressa em células proliferativas; incluindo células cancerígenas. Seu produto, o Ancp, é uma das proteínas mitocondriais mais abundantes e, quando disfuncional, está associada a diversas patologias, incluindo doenças neurodegenerativas. A disfunção mitocondrial tem sido sugerida como um evento inicial que precede o declínio cognitivo, e promove a agregação de proteínas patogênicas na DA (DA SILVA et al., 2024).

Nesse contexto, o transportador mitocondrial ADP/ATP (Ancp), um elo metabólico essencial entre a matriz mitocondrial e o citosol, desempenha um papel crítico na apoptose, pois forma o poro de transição de permeabilidade mitocondrial (mPTP), que em resposta a sobrecarga de cálcio leva ao inchaço maciço de mitocôndrias, e torna a membrana interna mais permeável. Conseqüentemente, há um colapso do potencial da membrana mitocondrial, ruptura da membrana externa e vazamento de moléculas como citocromo c, caspases e fatores iniciadores de apoptose, eventos críticos no declínio celular e em patologias neurodegenerativas. (CLÉMENÇON et al., 2013).

Além da via descrita, o *SLC25A5* tem sido implicado em importantes vias metabólicas que sustentam a homeostase das células imunes e a regulação dos níveis de glicose. No entanto, são necessários mais estudos para confirmar essas associações. Dessa forma, o gene *SLC25A5* tem demonstrado um potencial valor clínico como marcador preditivo e prognóstico (CHEN et al., 2022).

Em 2019, Yang e colaboradores analisaram a árvore filogenética da família dos transportadores mitocondriais em diferentes espécies animais, identificando regiões de codificação conservadas entre elas. No estudo, demonstraram que o gene *SLC25A5*, foco desta pesquisa, apresenta alta semelhança entre humanos e ratos, como ilustrado no esquema representativo da árvore filogenética na Figura 4.

FIGURA 4. ÁRVORE FILOGENÉTICA DAS DIFERENTES PROTEÍNAS FORMADAS PELOS GENES *SLC25A4*, *SLC25A5* e *SLC25A6*.



FONTE: Adaptado de Yang et al., 2009.

2.3.2 *CAMK1D* e a Doença de Alzheimer

Este gene pertence à família das CaMKs (proteínas quinases dependentes de cálcio/calmodulina), composta por quatro isoformas (α , β , γ e δ), codificadas por genes distintos. A proteína codificada, CAMK1, é amplamente expressa, principalmente no cérebro. Sua estrutura consiste em três domínios principais: o domínio de quinase, o domínio de ligação à CaM (calmodulina) e o domínio autoinibitório (AID) (“CAMK1D calcium/calmodulin dependent protein kinase ID [*Homo sapiens (human)*] - Gene - NCBI”, 2024; GRANT et al., 2021).

O íon Ca^{2+} , cofator para a enzima CAMK1D, desempenha também um papel central na regulação de quase todas as atividades intracelulares, incluindo liberação de neurotransmissores, plasticidade sináptica, expressão gênica e diversas outras funções celulares. Em células-tronco neurais, o equilíbrio dinâmico do Ca^{2+} entre o citoplasma e as mitocôndrias é cuidadosamente regulado por receptores, canais, bombas, antiportadores, tampões e sensores presentes no retículo endoplasmático e nos pontos de contato entre este e as membranas mitocondriais (GRANT et al., 2021). Esse equilíbrio também é influenciado pela ação do gene *SLC25A5*, previamente discutido no tópico anterior.

Alterações na homeostase do Ca^{2+} podem resultar em sobrecarga desse íon, desencadeando disfunções metabólicas como mudanças na arquitetura e dinâmica mitocondrial, degradação da plasticidade sináptica e neuroinflamação. Esses processos contribuem para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas em adultos. Especificamente na DA, a hipótese do cálcio propõe que distúrbios na homeostase do Ca^{2+} atuam como fatores determinantes na patogênese da doença (KONG et al., 2024).

Riascos et al. (2014) associaram a redução da expressão do *CaMK1D* em neurônios colinérgicos do prosencéfalo basal de pacientes com DA, à maior vulnerabilidade desses neurônios, e também ao desenvolvimento de emaranhados neurofibrilares característicos da patologia. Essa redução pode comprometer a fosforilação de proteínas essenciais para a formação e manutenção de sinapses, bem como para outras funções celulares, como a ativação de fatores de transcrição cruciais, incluindo o CREB (*cAMP Responsive Element Binding Protein*), indispensável para a expressão de genes relacionados à sobrevivência neuronal e à plasticidade sináptica. Por outro lado, a ativação do *CAMK1D*, em resposta ao

aumento dos níveis intracelulares de cálcio, desempenha um papel neuroprotetor, mitigando a excitotoxicidade, um dos principais mecanismos envolvidos na neurodegeneração.

Portanto, o gene *CAMK1D* destaca-se como um elemento cuja disfunção está intimamente ligada aos mecanismos patológicos da DA. O estudo aprofundado de sua expressão e atividade, tanto em tecidos cerebrais quanto periféricos, tem o potencial de esclarecer aspectos fundamentais da neurodegeneração, contribuindo para a identificação de novos alvos terapêuticos e estratégias diagnósticas para a DA (KONG et al., 2024).

2.3.3 Técnicas para Análise de Expressão Gênica

Mensurar e compreender as alterações de expressão gênica na DA é essencial para a elucidação de seus mecanismos moleculares. São diversas as técnicas existentes para essa finalidade, cada uma se adapta a um contexto de pesquisa específico. A RT-qPCR é padrão ouro, e destaca-se como uma das mais utilizadas devido à sua alta precisão, sensibilidade e rapidez na obtenção de resultados, podendo ser usada em amostras com baixa concentração de material genético (TAYLOR et al., 2019). Essa técnica baseia-se na reação em cadeia da polimerase (PCR), combinada com a marcação por sondas fluorescentes, permitindo a amplificação exponencial do material genético, bem como seu monitoramento e quantificação em tempo real (BUSTIN et al., 2009). O estudo conduzido por Hortiga (2024), ilustra a aplicabilidade dessa técnica ao investigar a expressão de sete genes, incluindo *Camk1d* e *Slc25a5*, em amostras de córtex e hipocampo de modelos animais da Doença de Alzheimer. Os resultados, encontraram valores significativos e reproduzíveis dentro do trabalho, reforçando a adequação da RT-qPCR como ferramenta confiável para a análise de expressão gênica em contextos experimentais.

O RNA-Seq, os microarrays, o northern blot, e a hibridização in situ (ISH), também são técnicas utilizadas para análises da expressão gênica. O RNA-Seq é especificamente indicado em estudos que requerem a quantificação de dezenas a centenas de alvos, fornecendo uma análise abrangente do transcriptoma (TAYLOR et al., 2019). No entanto, para atingir alta sensibilidade e precisão, o RNA-Seq

demanda uma maior quantidade de amostra (cerca de 250 ng) e envolve um custo mais elevado. Já os microarrays, permitem a análise simultânea de milhares de genes por meio da hibridização do RNA com sondas específicas em uma superfície sólida, são mais práticos para comparações rápidas entre perfis de expressão gênica, porém são menos sensíveis que o RNA-Seq e a RT-qPCR (RICCIARELLI et al., 2004). O Northern blot é útil para identificar isoformas de RNA ou alterações em sua integridade, baseando-se na separação por eletroforese, transferência para uma membrana e hibridização com sondas marcadas. No entanto, apresenta menor sensibilidade, exige grandes quantidades de RNA e é um método trabalhoso e demorado (WIEGARD et al., 2021). Já a hibridização in situ (ISH) permite visualizar a expressão gênica diretamente em cortes de tecido fixados, porém sua aplicação é limitada pela complexidade do protocolo, dificuldade de padronização e restrição no número de alvos analisáveis por vez (RAMOS, 2021). Assim, a escolha da técnica depende dos objetivos do estudo, orçamento e tipo de amostra, sendo a RT-qPCR a mais adequada para este trabalho.

2.4 MODELO ANIMAL

Os modelos animais são ferramentas valiosas no estudo dos mecanismos subjacentes às doenças neurodegenerativas. Sistemas modelo, como ratos e camundongos, têm sido amplamente utilizados para reproduzir características distintivas dessas patologias, oferecendo contribuições relevantes para a compreensão dos mecanismos patológicos envolvidos (GITLER; DHILLON; SHORTER, 2017).

Os modelos experimentais utilizados para estudar a DA incluem diversas abordagens, como exemplo os modelos transgênicos, que se baseiam na superexpressão de genes humanos relacionados à DA, como APP e PSEN1; levando à deposição de placas de β -amiloide ($A\beta$). Apesar de contribuírem para o entendimento da patologia, esses modelos não reproduzem completamente a complexidade da DA esporádica. Os modelos *seed injection*, no português “injeção de sementes”, utilizam materiais patológicos, como lisados cerebrais post-mortem de pacientes com DA ou tau recombinante, para investigar a propagação da patologia. No entanto, essa técnica é mais invasiva, apresentando maior dificuldade experimental e maior variabilidade nos resultados (YOKOYAMA et al., 2022).

Já os modelos de neuroinflamação, exploram a ativação da microglia e a relação entre inflamação. Um exemplo deste grupo é o modelo icv-STZ, ou seja, um modelo animal para DA induzida por injeção intracerebroventricular de estreptozotocina (icv-STZ). Ele tem sido considerado um modelo apropriado para o estudo da demência esporádica da DA, e se baseia na injeção intracerebroventricular (ICV) de doses baixas (0,1–3 mg/kg) e subdiabetogênicas do fármaco estreptozotocina (STZ) em roedores. As injeções de ICV-STZ provocam uma neuroinflamação intensa que se torna crônica, resultando em um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias e neurotóxicas. Esse processo desencadeia um ambiente caracterizado por estresse oxidativo, culminando na morte neuronal. Além disso, a STZ aumenta a atividade microglial dos oligômeros de depuração A β de maneira eficiente, caracterizando assim o modelo STZ. (ANDRADE et al., 2023). Esses danos desencadeiam mudanças cerebrais semelhantes às observadas nos pacientes com DA. Logo, denota-se uma ferramenta robusta para a investigação de hipóteses de forma controlada, possibilitando a obtenção de amostras de tecidos específicos. Essa abordagem é especialmente fundamental para análises de expressão gênica em tecidos cerebrais e colônicos, considerando as limitações éticas e práticas de realizar tais estudos diretamente em seres humanos.

3. JUSTIFICATIVA

O avanço no entendimento da DA é crucial, dada sua crescente incidência e impacto significativo na qualidade de vida dos pacientes, de seus familiares, além dos custos governamentais associados e da dificuldade em seu diagnóstico, sendo grande parte deles tardios (ZHANG et al., 2021).

A associação entre o SNC e SNE tem sido objeto de crescente interesse na pesquisa científica. Estudos recentes destacam a associação entre desordens no SNE e o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, incluindo a DA (JIN et al., 2023). A comunicação entre esses sistemas envolve complexas vias de sinalização, nas quais a expressão gênica desempenha um papel relevante, mas ainda em grande parte desconhecido (PELLEGRINI et al., 2020). Em estudos preliminares do mesmo grupo de pesquisa do presente trabalho, a análise da expressão dos genes *Camk1d* e *Slc25a5* revelou uma tendência biológica de expressão diferencial nos tecidos cerebrais de modelos animais com DA, comparado ao grupo controle (DA SILVA; 2024). Além disso, dados provenientes do NCBI indicam que esses genes apresentam níveis de expressão relevantes no cólon, sugerindo seu possível envolvimento entre o SNC e o SNE.

Apesar de avanços na área, faltam estudos que englobam a expressão desses genes no intestino e no cérebro, abordando o papel do eixo intestino-cérebro nessa relação, principalmente em um contexto de patologia de Alzheimer. Ademais, as investigações que integrem o SNC, o SNE e as doenças neurodegenerativas são relativamente recentes, com um aumento significativo nas publicações na última década. Logo, o mecanismo de interação carece de explicações, com diversas lacunas que evidenciam a necessidade de mais pesquisas nesse campo (ADEWUYI et al., 2022).

Portanto, o presente estudo busca investigar essa relação, por meio da experimentação animal, uma abordagem amplamente usada, que permite o controle das variáveis experimentais e manipulação de modelos específicos de doença, como a DA (HORTIGA, 2024). A análise será conduzida utilizando a técnica de RT-qPCR, que se destaca por sua alta sensibilidade e especificidade na quantificação de níveis de expressão gênica (TAYLOR et al., 2019). Espera-se contribuir para o entendimento das bases moleculares da DA em um contexto

periférico, aprofundando o conhecimento sobre a interação entre SNC, SNE e os mecanismos da neurodegeneração.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Investigar a relação entre o sistema nervoso central e o sistema nervoso entérico em modelo animal de Alzheimer, por meio da análise da expressão dos genes *Camk1d* e *Slc25a5* em amostras de cólon, hipocampo e córtex.

4.2 Objetivo Específico

- Investigar como o eixo intestino-cérebro é influenciado na DA, com foco em compreender as interações entre vias aferentes e eferentes, explorando o impacto de uma desregulação inicial no SNC sobre mecanismos periféricos e seus efeitos no intestino.
- Comparar a expressão dos genes *Camk1d* e *Slc25a5* em amostras de cólon, hipocampo e córtex, entre grupo de modelo animal de Alzheimer induzido e grupos controle cognitivo saudável.
- Avaliar o uso da expressão gênica para análise de interação entre SNC e SNE.
- Avaliar as vias metabólicas em que os genes *CAMK1D* e *SLC25A* participam e sua relação com a DA.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ANÁLISE DE VIAS ENRIQUECIDAS

Para revelar as funções e as vias de sinalização associadas aos genes *SLC25A5* e *CAMK1D*, foi realizada a ORA (do inglês, *Over Representation Analysis*). Um método de análise de enriquecimento, que avalia se as vias e processos biológicos estão super expressos (ou enriquecidos) em uma lista de genes em comparação com o que seria esperado por acaso. As análises foram realizadas usando o *software R*.

Foi realizada a análise de enriquecimento de ontologia gênica (GO) para função molecular (MF), que representa as atividades moleculares dos produtos genéticos; e para processo biológico (BP), representando vias e processos biológicos mais impulsionados pelas atividades dos produtos genéticos. Além da Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), uma coleção de vias que representam redes de interação molecular metabólicas, e sua relação com doenças. A análise ocorreu por meio do uso dos seguintes pacotes: *clusterProfiler*, *openxlsx*, *DOSE*, *enrichplot*, *ggplot2*, *readxl*, *ggrepel*, *ggraph* e *stringr*.

Os valores de p foram calculados usando a distribuição hipergeométrica (Boyle et al., 2004). Os limites de significância foram definidos com um *pvalueCutoff* de $\leq 0,01$ e um *qvalueCutoff* de $\leq 0,05$. O método Benjamini & Hochberg foi aplicado para ajuste do valor de p.

Termos-chave foram usados para filtrar categorias enriquecidas relevantes para DA. Os termos-chave usados foram "alzheimer", "alzheimer disease", "alzheimer's disease", "amyloid", "beta amyloid", "beta-amyloid", "neuroinflammatory", "neurodegeneration", "neuroaging", "neuroinflammation", "senescence", "dementia", "tau-protein", "tau protein", "apoptosis", "neuron", "synapse", "memory", "memory loss", "cognition", "neurotransmitter", "aging". Gráficos e diagramas de barras foram gerados a partir dos resultados do enriquecimento para representar os resultados.

5.2 AMOSTRAS

Um total de 21 ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*) foram utilizados neste estudo. Os animais foram distribuídos em dois grupos experimentais: o grupo SHAM, composto por 8 animais controle sem a indução para DA, e o grupo STZ, modelo experimental da Doença de Alzheimer, composto por 13 animais submetidos à cirurgia estereotáxica com injeção intracerebroventricular de estreptozotocina (causando resistência à insulina e alterações neuropatológicas, como neuroinflamação, estresse oxidativo, morte celular e redução da plasticidade sináptica). Como validação do modelo, os animais passaram por testes comportamentais após a etapa cirúrgica, como o teste do campo aberto, o teste de localização e reconhecimento de objeto e teste do labirinto em Y, com o objetivo de avaliar a atividade cognitiva dos animais. Vinte e um dias após a cirurgia, os ratos de ambos os grupos foram eutanasiados por sistema de guilhotinamento, após sedação com hidrato de cloral. Amostras de hipocampo, córtex e cólon (parte sigmoide) foram coletadas e armazenadas em RNAlater™ (Thermo Fisher Scientific, EUA), mantidas em gelo e posteriormente congeladas a -80°C . Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Paraná, sob o número 1494/2022. A descrição detalhada do protocolo experimental e dos resultados dos testes comportamentais encontram-se no trabalho de Hortiga (2024).

5.3 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL

A extração de RNA foi realizada utilizando o kit de extração mirVana PARIS kit (*Protein and RNA Isolation System, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, USA*), conforme orientações do fabricante, e em ambiente esterilizado e higienizado com *RNaseZap™ Decontamination Solution*. Para aferir a concentração e qualidade das amostras extraídas, foi utilizado o equipamento *NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA)*. As razões de absorbância A260/A280 e A260/A230 também foram analisadas, para avaliar a pureza do RNA. Valores ideais estão entre 1,8 e 2,2, indicando ausência de contaminantes como proteínas e fenois. As médias de concentração e pureza (260/280) ficaram dentro da faixa de referência, mas o parâmetro de contaminação (260/230) das amostras cerebrais ficou ligeiramente

abaixo. Já as amostras de cólon apresentaram concentrações de RNA extraído mais altas, devido à maior quantidade de tecido coletado. Os detalhes estão na Tabela 1.

TABELA 1 - MÉDIA DA QUANTIDADE DE RNA EXTRAÍDO DAS AMOSTRAS, E SEUS RESPECTIVOS VALORES DE PUREZA E CONTAMINAÇÃO

	[] ng/ml	260/280	260/230
Hipocampo	547,68	2,09	1,57
Córtex	366,32	2,08	1,29
Cólon	1494,88	2,10	1,87

FONTE: (AUTOR; 2024)

Conforme Bustin et al. (2009), a quantificação realizada por espectrofotometria no Nanodrop pode apresentar limitações de precisão, e valores fora da faixa ideal podem ser aceitos para análise subsequente. As concentrações obtidas foram padronizadas para um uso final de 1000 ng na etapa de tratamento com DNase, conforme orientações do fabricante, assim como nas etapas subsequentes do protocolo experimental.

5.4 RETROTRANSCRIÇÃO

Após a extração do RNA, foi feito o tratamento com DNase I, livre de RNase (*Thermo Fisher Scientific*, EUA); e em seguida, a produção de DNA complementar (cDNA) a partir do RNA, com o Kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription*; ambos seguindo o protocolo do fabricante. Foram separadas seis amostras “RT-” como controle negativo da retrotranscrição, nas quais a enzima transcriptase reversa não foi adicionada. Essas amostras foram utilizadas para verificar a ocorrência de amplificação, indicando possível contaminação por DNA genômico, bem como para avaliar a especificidade do ensaio. E como esperado, não amplificaram.

5.5 qPCR

A Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR) foi realizada em triplicata para garantir a confiabilidade dos resultados. O método de detecção aplicado consistiu no corante intercalante do kit *SYBR™ Green PCR Master Mix*. Como controle endógeno, utilizou-se o gene GAPDH, que codifica a

enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, e possui expressão constitutiva. Esse gene é amplamente encontrado em diferentes tecidos, incluindo o cérebro e o cólon, apresenta alta estabilidade e é bastante utilizado como referência em estudos de expressão gênica (ADEOLA, 1970).

Os primers utilizados foram previamente avaliados quanto à eficiência, por meio de um *pool* de amostras de cDNA a uma concentração inicial de 100 ng/μl, submetido a quatro diluições seriadas com fator igual a dois (1:2, 1:4, 1:8, 1:16). Ambos os *primers* demonstraram valores de eficiência dentro dos parâmetros aceitáveis, sendo 93,3% para *Slc25a5* e 89,6% para *Camk1d*. Segundo Rodríguez et al. (2015), a faixa ideal de eficiência para primers em PCR varia entre 90% e 110%, embora valores entre 86% e 112% também sejam considerados adequados. Na Tabela 2, estão apresentadas as sequências específicas dos *primers* para os genes analisados.

TABELA 2 - SEQUÊNCIA DOS PRIMERS USADOS NAS REAÇÕES DE qPCR

Primer		Sequence (5'→3')
<i>CAMK1D</i>	Forward	TCCTGGAAAAAGCAAGCGGA
	Reverse	TCAGAAAAGGCCCCAGTTCC
<i>SLC25A5</i>	Forward	CAAGACGGCGGTAGCACCC
	Reverse	CGCAGTCTATGATGCCCTTGTA
<i>GAPDH</i>	Forward	GTTACCAGGGCTGCCTTCTC
	Reverse	GATGGTGATGGGTTTCCCGT

FONTES: (AUTOR; 2024)

Para cada gene, foi preparado um *mix* com a seguinte composição por reação: 5 μl de *SYBR Green*; 0,3 μl de *primer reverse* e 0,3 μl de *primer forward* específico, e 3,4 μl de água ultrapura. Para cada amostra, foi preparado um submix contendo 10 μl do mix inicial e 1,1 μl da amostra; de modo que a amostra fique a uma diluição de 1:10. Deste submix, 3 μl foram transferidos para cada poço de uma placa de 384 poços, formando as triplicatas, e o experimento foi conduzido no equipamento *ViiA 7 Real-Time PCR (Applied Biosystems)*.

O programa de ciclismo incluiu uma etapa inicial de pré-anelamento a 50°C por 2 minutos, para estabilizar os complexos *primer-DNA*, seguida por uma desnaturação inicial a 95°C por 15 minutos. Posteriormente, o protocolo consistiu em

40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 60°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 45 segundos.

5.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

Com os dados brutos gerados por RT-qPCR, em um primeiro momento foi realizada sua normalização, ajustando os valores de Ct (*Cycle Threshold*) dos genes alvos em relação ao gene controle endógeno (GAPDH), etapa essencial para minimizar variações técnicas e biológicas não relacionadas ao experimento. Essa etapa resulta nos valores de ΔCT dos genes alvos do grupo DA e do grupo CTRL. Em seguida, foi realizado o cálculo $2^{(-\Delta\Delta CT)}$, método que determina a expressão relativa dos genes, por meio da diferença entre o ΔCT do grupo DA, com a média do ΔCT do grupo CTRL. Por fim, foram aplicados testes estatísticos apropriados às características dos dados. Essas análises foram realizadas utilizando o *software* R.

Assim, foi possível obter os valores de FC (*Fold Change*), o qual indica quantas vezes um gene está mais expresso na amostra teste em relação à amostra controle, onde $FC > 1$ sugere superexpressão, $FC = 1$ indica expressão inalterada e $FC < 1$ aponta para uma menor expressão (LÖTSCH; KRINGEL; ULTSCH, 2024).

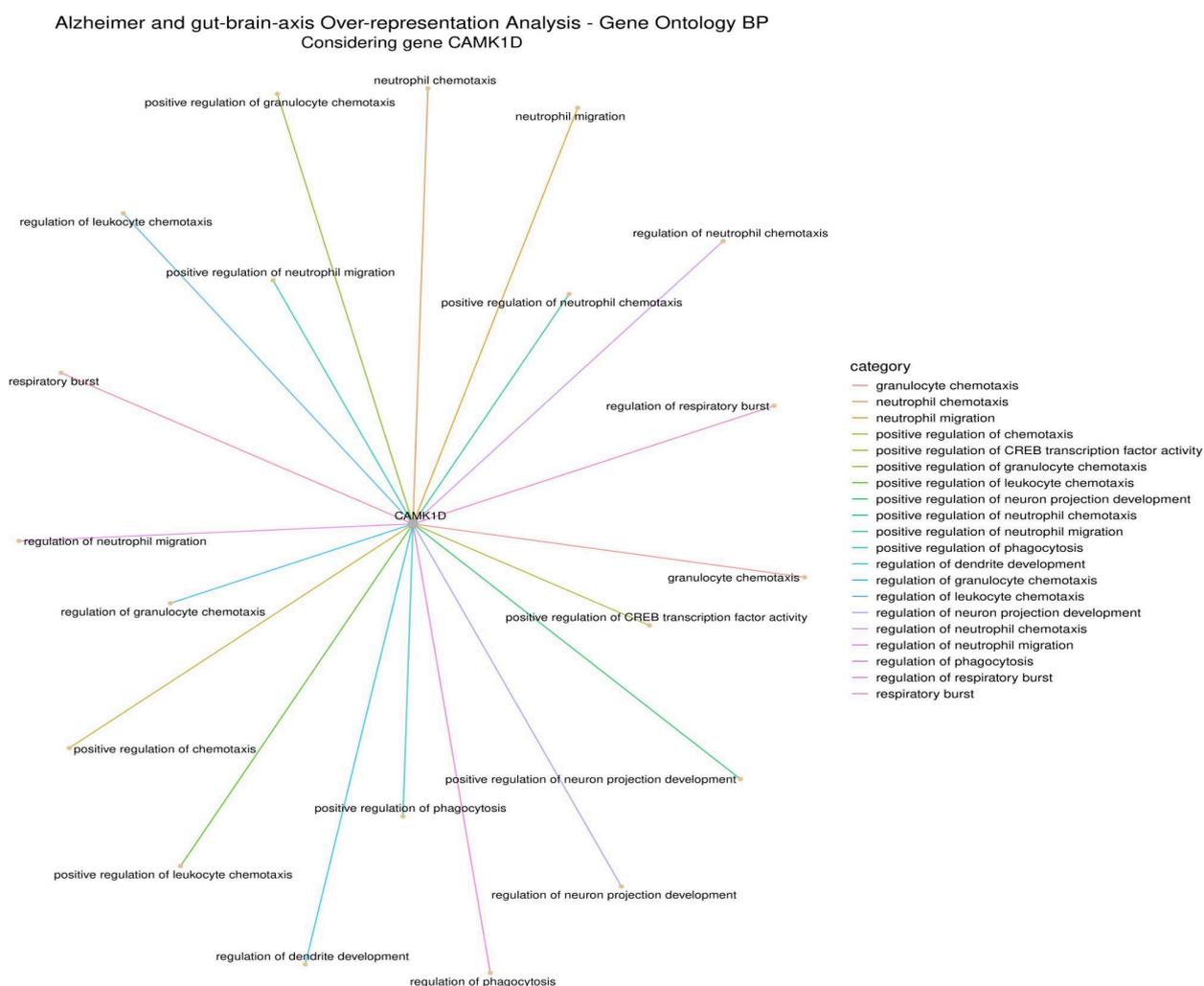
Diversos pacotes do *software* R foram empregados para o processamento dos dados de qPCR. O pacote *openxlsx* foi utilizado para a importação e manipulação dos dados, o *dplyr* para a organização e a preparação destes para análise, já o pacote *dlookr* auxiliou na avaliação da qualidade dos dados brutos, identificando outliers e possíveis problemas com os valores de Ct antes da análise estatística. A normalidade dos dados foi verificada com o teste de Shapiro-Wilk, e os dados foram visualizados e analisados estatisticamente utilizando *ggstatsplot*, que permitiu a criação de gráficos ilustrando média ou mediana, e desvio padrão, além da aplicação de testes estatísticos adequados.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 ANÁLISE DE VIAS ENRIQUECIDAS

Através da ORA, análise de superexpressão, foram identificadas as funções e as vias de sinalização de *SLC25A5* e *CAMK1D* mais expressas. Nesse âmbito, as análises de GO e KEGG pelo *software R* permitiram identificar as redes de interação molecular e as vias biológicas enriquecidas. Esses resultados foram apresentados por meio de gráficos de barras e diagramas de interação gênica, exemplificados nas Figuras 5 e 6. As demais imagens relacionadas encontram-se disponíveis no Apêndice 1. Um resumo das análises realizadas é apresentado na Tabela 3.

FIGURA 5 - DIAGRAMA DE INTERAÇÃO GÊNICA DE PROCESSOS BIOLÓGICOS ASSOCIADOS AO GENE CAMK1D SEGUNDO A GENE ONTOLOGY



FONTE: (AUTOR; 2024)

FIGURA 6 -GRÁFICO DE BARRAS DE PROCESSOS BIOLÓGICOS ASSOCIADOS AO GENE *CAMK1D* SEGUNDO A GENE ONTOLOGY - COM OS VALORES DE P AJUSTADOS

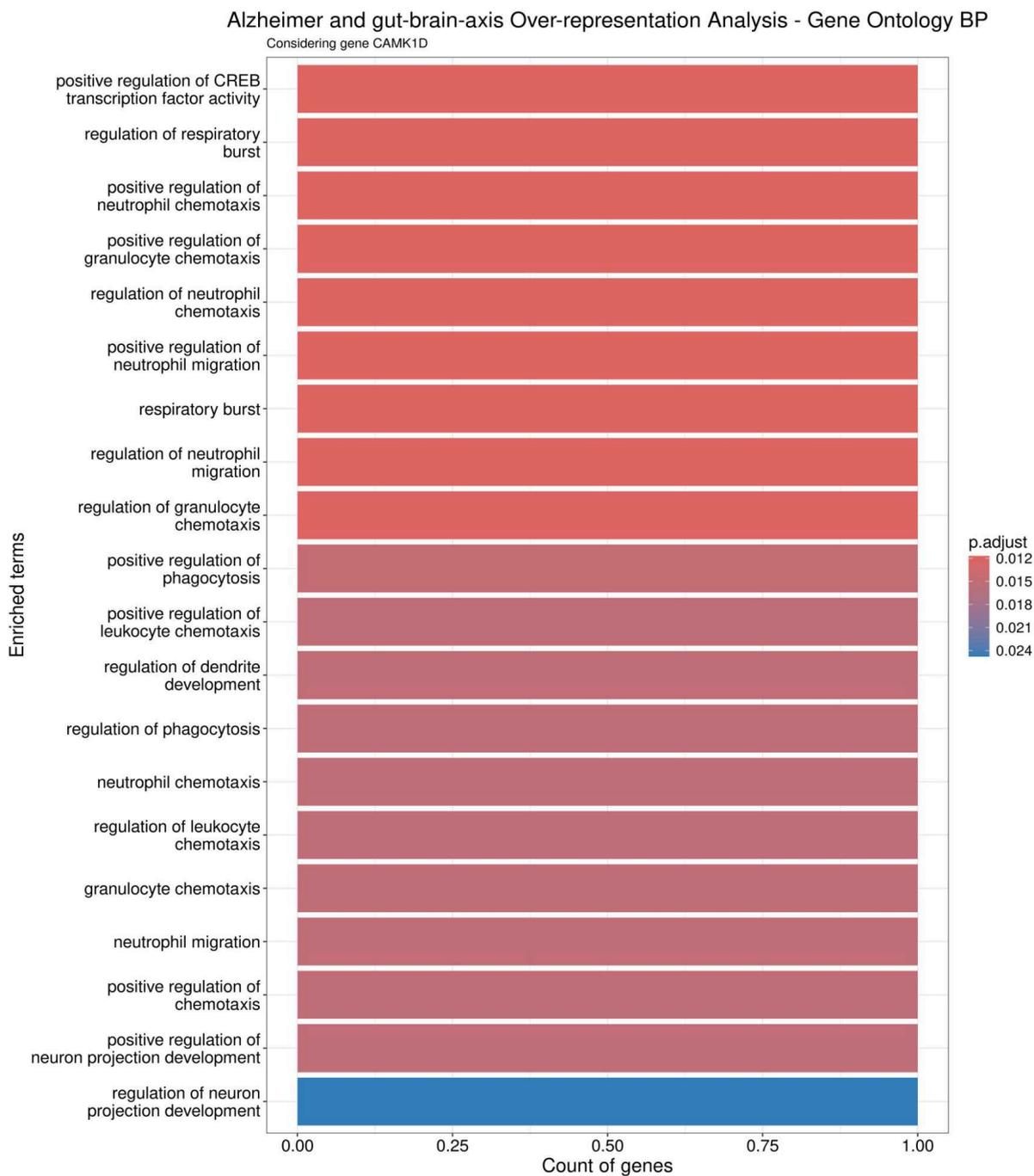


TABELA 3 - VIAS BIOLÓGICAS ENRIQUECIDAS PARA OS GENES
SLC25A5 e *CAMK1D* NA DOENÇA DE ALZHEIMER ($p \leq 0,05$)

Gene	Banco de dado	Categoria	(N°)	Descrição
CAMK1D	Gene Ontology	BP (Biological Process)	1	respiratory burst
			2	positive regulation of neuron projection development
			3	regulation of dendrite development
			4	positive regulation of CREB transcription factor activity
			5	positive regulation of neutrophil chemotaxis
			6	positive regulation of granulocyte chemotaxis
			7	positive regulation of leukocyte chemotaxis
			8	positive regulation of phagocytosis
		MF (Molecular function)	9	calmodulin-dependent protein kinase activity
			10	calmodulin binding
			11	protein serine kinase activity protein serine/threonine kinase activity
	KEGG	Metabolic pathways, Gene-disease interaction	12	Glioma
			13	Aldosterone synthesis and secretion
			14	oxytocin signaling pathway
			15	Calcium signaling pathway
SLC25A5	Gene Ontology	BP (Biological Process)	16	purine nucleobase transport
			17	ADP transport
			18	nucleobase transport
			19	positive regulation of mitophagy
			20	ATP transport
			21	regulation of mitochondrial membrane permeability
			22	permeability involved in apoptotic process
		MF (Molecular function)	23	active transmembrane transporter activity
			24	adenine nucleotide transmembrane transporter activity
			25	ADP transmembrane transporter activity
			26	ATP transmembrane transporter activity
	27	ubiquitin-like protein ligase binding		
	KEGG	Metabolic pathways, Gene-disease interaction	28	Alzheimer disease
			29	Calcium signaling pathway
			30	Cellular senescence
			31	CGMP-PKG signaling pathway
			32	Chemical carcinogenesis - reactive oxygen species
			33	Diabetic cardiomyopathy

			34	Human T-cell leukemia virus 1 infection
			35	Huntington disease
			36	Influenza A
			37	Necroptosis
			38	Neutrophil extracellular trap formation
			39	Parkinson disease
			40	Pathways of neurodegeneration - multiple diseases
			41	Prion disease
			42	Spinocerebellar ataxia

FONTE: (AUTOR; 2024)

Conforme visto previamente, o *SLC25A5* atua na manutenção do metabolismo energético, por meio de processos biológicos como o Transporte de ADP (17) e ATP (20) e pela Regulação positiva da mitofagia - remoção seletiva de mitocôndrias disfuncionais (19), sendo importante na prevenção da disfunção mitocondrial e do acúmulo de ROS (CLÉMENÇON et al., 2013). Tais processos estão associados à função molecular (MF) de atividade do transportador transmembrana (23) e (24). Além disso, a análise de Vias metabólicas identificadas pelo KEGG, como Doença de Alzheimer (28), Carcinogênese química - ROS (32) e Vias de neurodegeneração - múltiplas doenças (40), conectam a desregulação do *SLC25A5* ao aumento do estresse oxidativo, ativação de processos inflamatórios (38) e perda da integridade neuronal (PAIDLEWAR et al., 2024). A participação em vias como a Sinalização do cálcio (29) e de Sinalização cGMP-PKG (31) reforça a relevância do equilíbrio energético e redox, com impacto na permeabilidade mitocondrial e neuroproteção (FERREIRA; WONG; SCHLICHTER, 2015).

Por outro lado, o *CAMK1D* está envolvido em processos de sinalização intracelular mediados por cálcio, sendo essencial para a plasticidade sináptica e o desenvolvimento neuronal (GRANT et al., 2021). As MF representadas, como Atividade da calmodulina dependente de cálcio (9) e Atividade da proteína serina/treonina quinase (11), destacam sua capacidade de modular a atividade de proteínas por fosforilação, regulando vias relacionadas à memória e à sobrevivência celular (RIASCOS et al., 2014). A Regulação da fagocitose (8) também é essencial no contexto neuroprotetor, uma vez que está relacionada à função da microglia na remoção de placas beta-amiloides, um dos marcos patológicos da DA. Por fim, a Regulação positiva da quimiotaxia (5), (6) e (7) constata o papel do *CAMK1D* na modulação de respostas celulares ao acúmulo de resíduos tóxicos, promovendo a

atração de elementos do sistema imune (FEI et al., 2023).

Entre os BP mais relevantes, a Regulação positiva da transcrição do fator de atividade de CREB (4) - uma proteína que, quando ativada e fosforilada, ativa genes em resposta ao dano no DNA (RIASCOS et al., 2014); está diretamente associada à plasticidade sináptica e à memória, enquanto a Regulação do desenvolvimento de dendritos (3) e de projeção neural (2) enfatizam seu papel na manutenção das conexões neurais, comprometidas na DA. A análise KEGG reforça essa relevância ao associar o *CAMK1D* a vias como a da Sinalização de cálcio (15) , e Sinalização de oxitocina (14), que conectam a disfunção do gene à regulação da resposta celular ao estresse, ambos fundamentais para o equilíbrio neuronal, além de, em larga proporção afetar a regulação comportamental e social pela (14) (TAKAHASHI et al., 2023).

Juntos, *SLC25A5* e *CAMK1D* atuam em mecanismos complementares que sustentam a saúde neuronal. No contexto da DA, as alterações na expressão e na funcionalidade desses genes podem amplificar processos patológicos, como a disfunção mitocondrial, o acúmulo de ROS, a neuroinflamação e o declínio cognitivo. Essas interações destacam a importância de investigar a regulação de ambos os genes para entender os mecanismos subjacentes à DA.

6.2 RT-qPCR

Os dados brutos gerados pelo sistema *ViiA™ 7 Real-Time PCR* consistiram nos valores de Ct para cada amostra analisada. Estes indicam o ciclo em que a fluorescência ultrapassa o limite de detecção, sinalizando a presença do produto amplificado. Os valores de Ct são inversamente proporcionais à quantidade inicial de material genético, e quando são muito altos, tendem a aumentar a taxa de variabilidade e desvios, comprometendo a confiabilidade dos dados. Segundo Taylor e seus colaboradores (2017), um valor de Ct ideal situa-se abaixo de 30, pois reflete uma boa amplificação do alvo e reduz a variabilidade nos resultados. Nesse contexto, a amplificação apresentou resultados satisfatórios em geral, com médias de Ct adequadas e baixo desvio padrão, indicando uma amplificação eficiente, os valores estão representados no Apêndice 3. Contudo, cinco amostras precisaram ser excluídas devido à falha na amplificação em duas tentativas de placas. Essas amostras incluem: para o gene *Slc25a5*, duas amostras de hipocampo do grupo STZ

e duas amostras de cólon do grupo SHAM; e para o gene *Camk1d*, uma amostra de córtex do grupo STZ.

6.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

Após a normalização dos valores de Ct e o cálculo do $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ realizado no *software R*, verificou-se que os dados apresentavam distribuição não paramétrica, embora próximos da normalidade, observado na Tabela 4. Em relação às variâncias, observou-se heterocedasticidade, ou seja, a dispersão dos dados não foi uniforme; com exceção das amostras de hipocampo relacionadas ao gene *Camk1d*, que apresentaram distribuição normal. Essa avaliação foi realizada por meio do teste de Shapiro-Wilk, os valores de W e p, estão descritos na Tabela 4.

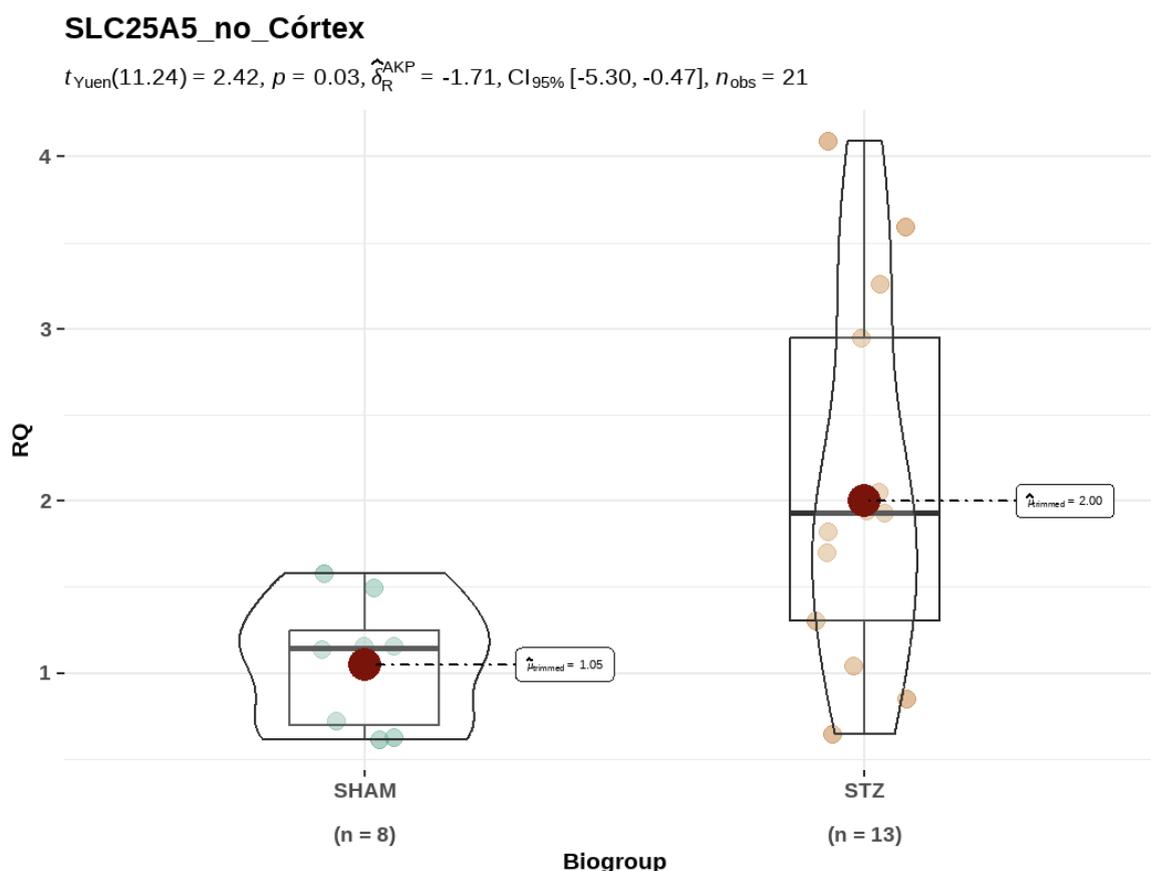
TABELA 4 - RESULTADOS DO TESTE DE SHAPIRO-WILK

		W	valor de p
Slc25a5	Hipocampo	0,863	0,011*
	Córtex	0,878	0,013*
	Cólon	0,876	0,018*
Camk1d	Hipocampo	0,950	0,342
	Córtex	0,895	0,034*
	Cólon	0,840	0,002*

O valor de W, é uma métrica que indica a proximidade dos dados com a distribuição normal, quanto mais próximo de 1, maior a conformidade. O valor de p associado ao teste expressa a probabilidade dos resultados observados serem compatíveis com a hipótese nula (a qual supõe que há distribuição normal dos dados); rejeita-se a hipótese nula quando $p \leq 0,05$. FONTE: (AUTOR; 2024).

Diante disso, o teste estatístico T Yuen foi aplicado para amostras com dados não paramétricos, pelo script do *software R*. Esse teste é uma versão robusta do teste T de Student, projetado para lidar com violações da normalidade e da homogeneidade de variâncias, sendo menos sensível a *outliers*. Para a amostra com os dados paramétricos, foi aplicado o teste T de Student. Como resultado final, foram gerados os gráficos de violino, que ilustram os valores de RQ (quantificação relativa em relação ao normalizador) e sua distribuição, como exemplo está representado na Figura 7. O restante dos gráficos gerados encontram-se no Apêndice 2.

FIGURA 7. QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DO GENE Slc25a5 NO CÓRTEX DE RATOS DO GRUPO CONTROLE (SHAM) VS. RATOS DO GRUPO ALZHEIMER (STZ).



LEGENDA: RQ - Quantificação Relativa em relação ao controle interno (GAPDH), SHAM - Grupo controle sem indução a DA, STZ - grupo com DA, n - número amostral de cada grupo. FONTE: (AUTOR; 2024).

A partir dos valores de RQ, obtidos por meio dos gráficos gerados, foi calculada a razão comparativa entre o grupo Alzheimer (numerador) e o grupo controle (denominador), com o objetivo de determinar o número de vezes em que a expressão gênica é maior ou menor em um grupo (alvo) em relação ao outro (referência), ou seja, os valor de FC. Os resultados dessa análise estão apresentados na Tabela 5.

TABELA 5 - RQ MÉDIO, FC E P DOS GRUPOS SHAM E STZ NAS AMOSTRAS DE HIPOCAMPO, CÓRTEX E CÓLON PARA OS GENES *Slc25a5* E *Camk1d*

		RQ SHAM	RQ STZ	FC	Valor de p
<i>Slc25a5</i>	Hipocampo	1,13	1,68	1,49	0,05*
	Córtex	1,05	2,00	1,90	0,03*
	Cólon	1,06	0,59	0,56	0,26
<i>Camk1d</i>	Hipocampo	1,14	0,77	0,68	0,14
	Córtex	1,08	0,62	0,57	0,09
	Cólon	1,38	0,34	0,25	0,04*

LEGENDA: RQ - Quantificação Relativa em relação ao controle interno (GAPDH), FC - diferença de expressão entre SHAM (Grupo controle sem indução à DA) e STZ (com DA). FONTE: (AUTOR; 2024).

Foram identificadas diferenças significativas na expressão do gene *Slc25a5* nas amostras de tecidos cerebrais dos ratos, com superexpressão de 1,49 vezes no hipocampo e de 1,90 vezes no córtex dos animais do grupo com Doença de Alzheimer. Em contrapartida, o gene *Camk1d* apresentou redução significativa de expressão em amostras de cólon associadas à patologia, de acordo com o indicado na tabela 5.

Conforme abordado na revisão de literatura, o gene *SLC25A5* codifica a proteína ANCP, que atua na formação de transportadores de ATP e ADP na membrana mitocondrial, logo, é fundamental para a produção de energia celular por meio da fosforilação oxidativa mitocondrial. A expressão desse gene é particularmente elevada em células com alta atividade metabólica, como aquelas envolvidas em processos de reparação tecidual. Ademais, o *SLC25A5* desempenha um papel crítico na apoptose, mediado pelo poro de transição de permeabilidade mitocondrial (CLÉMENÇON et al., 2013).

Diferente do restante do corpo humano, onde o processo de cicatrização é mediado por fibroblastos e proliferação de células endoteliais; no contexto cerebral, o processo ocorre predominantemente por meio da astrogliose - mediada por astrócitos e microglia. Um aspecto central relacionado à astrogliose, é a ativação gênica e a transcrição de múltiplos fatores em resposta aos estímulos prejudiciais, e nesse cenário, a superexpressão de *SLC25A5* pode refletir um aumento da demanda energética em resposta a danos neurais. Essa reparação ocorre em situações de acúmulo de resíduos neurotóxicos, como proteínas mal dobradas ($A\beta$, p-tau e α -syn), ativando mecanismos inflamatórios, de remodelação e regeneração

neural limitada. Essa ativação astrocitária e microglial tem finalidade protetiva, porém, quando persistente, é prejudicial à saúde neuronal, levando à apoptose e morte celular (HAYDEN, 2023).

Ainda nesse contexto, a superexpressão do gene pode propiciar o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), decorrentes do processo de fosforilação oxidativa mitocondrial desbalanceado. Esse aumento excessivo pode levar ao estresse oxidativo, um evento bastante descrito nos mecanismos de patologias neurodegenerativas, como na DA (PAIDLEWAR et al., 2024). Esses achados destacam a importância da regulação do metabolismo energético e do equilíbrio redox na manutenção da integridade neuronal e na prevenção do agravamento da patologia.

Em relação ao gene *CAMK1D*, como discutido anteriormente, ele codifica quinases dependentes de cálcio, ou seja, enzimas que regulam diversas atividades intracelulares; como neurotransmissão, plasticidade sináptica e homeostase celular. Portanto, em situações em que há distúrbios na regulação do cálcio, ocorrem disfunções metabólicas que comprometem a função neuronal. Neste estudo, foi observada uma redução na expressão de *Camk1d*, corroborando dados da literatura, como os de Riascos et al. (2014), que associam essa diminuição à maior vulnerabilidade dos neurônios do prosencéfalo basal e à formação de emaranhados neurofibrilares, elementos característicos da DA. Embora, no presente trabalho, essa redução significativa tenha sido identificada apenas nos tecidos de cólon, é possível estabelecer uma correlação entre as células neurais do SNC e do SNE, considerando sua semelhança estrutural e integração funcional (WOOD, 2012).

Além disso, foi observada uma tendência biológica que sugere uma possível redução da expressão de *Camk1d* nos tecidos cerebrais. No entanto, a ausência de significância estatística nesses tecidos pode ser atribuída ao número limitado de amostras e à maior variabilidade dos resultados, possivelmente decorrente da delicadeza do modelo animal submetido a intervenções cirúrgicas. Esses fatores reforçam a necessidade de estudos futuros com maior poder estatístico para validar essas observações.

Dado o papel neuroprotetor do *Camk1d*, sua ativação pode mitigar os efeitos da excitotoxicidade induzida pelo aumento intracelular de cálcio. Assim, a redução observada na expressão desse gene, especialmente no SNE, pode refletir

alterações neurodegenerativas que afetam tanto o intestino quanto o cérebro, reforçando a hipótese de uma conexão entre esses sistemas na patogênese da DA.

Adicionalmente, a hipótese do cálcio na DA ganha suporte com estudos que mostram que placas beta-amiloides podem formar poros permeáveis a cálcio, e interagir com proteínas sinápticas como NMDAR, mGluR5 e VGCC. Essas interações levam a uma sobrecarga de cálcio nos neurônios, culminando em apoptose neuronal e contribuindo para a progressão da patologia (KONG et al., 2024, “KEGG PATHWAY: map05010”, 2015).

Além disso, no que diz respeito à expressão diferencial dos genes estudados no cólon de ratos com Alzheimer, os resultados obtidos neste trabalho se correlacionam com a pesquisa de Pellegrini et al. (2020), que identificaram agregados de A β e p-tau com padrões semelhantes em tecidos cerebrais e colônicos de camundongos modelo de Alzheimer SAMP8 (*Senescence Accelerated Mouse*). A presença dessas proteínas no trato entérico pode desencadear processos neurogênicos e inflamatórios análogos aos observados no cérebro, como disfunção mitocondrial e ativação de inflamassomas. No intestino, esses processos estão associados à redução da motilidade intestinal, um sintoma frequentemente relatado na DA, que, em muitos casos, precede os déficits cognitivos.

Interessantemente, Adewuyi e seus colaboradores (2022) identificaram correlações genéticas globais e locais significativas entre traços cognitivos e distúrbios gastrointestinais. Esses autores observaram que habilidades intelectuais (como nível de escolaridade) exercem um efeito causal protetor, sugerindo que podem reduzir o risco de doenças do TGI. Em contrapartida, patologias como o refluxo gastroesofágico foram associadas ao declínio cognitivo. Esses achados destacam a interconexão entre o TGI e o SNC.

O campo da literatura que investiga a comunicação bidirecional do eixo intestino-cérebro está em constante crescimento, e cada vez mais revelando contribuições significativas para a compreensão de doenças neurodegenerativas. Estudos têm demonstrado que essa interação ocorre por diferentes vias, como a produção de neurotransmissores no intestino, destacando-se a serotonina, cuja maior parte (90%) é sintetizada nesse órgão; também pelo nervo vago, que conecta o SNC ao SNE, transmitindo sinais relacionados à fome, saciedade e ao ambiente microbiano. Ainda, pela influência da microbiota intestinal, que gera metabólitos,

como ácidos graxos de cadeia curta, capazes de modular a neuroinflamação e a função cognitiva; e pelo sistema imunológico, que atua como uma ponte de comunicação integrando o SNC e o SNE (JIN et al; 2023).

No contexto da patologia de Alzheimer, há evidências que apontam para interações bidirecionais no eixo intestino-cérebro, sugerindo que agregados de A β podem se originar no intestino e migrar para o cérebro ou vice-versa. Essa migração ocorre pela corrente sanguínea, especialmente em condições em que a permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE) está aumentada, como em indivíduos idosos ou em estados patológicos; ou pelo nervo vago, envolvendo a disseminação entre neurônios e células como astrócitos e microglia. Esses processos podem ser exacerbados pela inflamação sistêmica. Tais mecanismos foram demonstrados por Jin et al. (2023) e Sun et al. (2020), que observaram a migração de agregados de A β para o SNC após microinjeções de A β marcado com fluorescência no trato gastrointestinal de modelos murinos.

Corroborando essa hipótese, Pils et al. (2024) identificaram níveis elevados de agregados de A β em análises fecais de pacientes com DA. O autor sugere que, a deposição de oligômeros de A β em placas amiloides no cérebro pode representar um mecanismo de depuração, para limpeza de elementos neurotóxicos, enquanto a excreção desses oligômeros para fora do cérebro seria uma via complementar, com o objetivo de ser detoxificada no fígado, e excretada para o intestino na bile. Ainda, devido ao aumento da permeabilidade da barreira intestinal associado à inflamação sistêmica, é plausível que agregados de A β presentes no sangue ou provenientes de neurônios entéricos entrem no lúmen.

O presente trabalho destaca a importância de compreender a comunicação bidirecional do eixo intestino-cérebro, especialmente no contexto da DA e distúrbios gastrointestinais. As evidências sugerem que alterações na expressão gênica associadas a agregados proteicos nesse eixo, refletem a complexidade das interações entre o SNC, o SNE e o sistema imunológico. Além disso, os resultados ressaltam a relevância da experimentação animal como ferramenta robusta para investigar hipóteses de forma controlada, permitindo a obtenção de amostras de tecidos específicos, como córtex, hipocampo e cólon, e a manipulação experimental. Embora o modelo de indução da DA (icv-STZ) reproduza características como neuroinflamação, estresse oxidativo, morte celular e redução da plasticidade

sináptica, ele não replica integralmente a natureza multifatorial e heterogênea da DA em humanos. Todavia, essa abordagem é fundamental diante das limitações éticas e práticas de realizar estudos diretamente em humanos.

Ainda, o estudo apresenta outras limitações, como o tamanho amostral reduzido, o que compromete a robustez estatística dos resultados. Futuras investigações devem ampliar o número de amostras, incluindo diferentes faixas etárias e sexos, comparando o perfil de LOAD e EOAD; para explorar variações na expressão gênica em diferentes tecidos, associadas a esses fatores. Além disso, seria relevante integrar análises ômicas, como transcriptômica e proteômica, para identificar outras vias moleculares envolvidas na interação entre o SNC e o SNE na DA. Estudos longitudinais também seriam interessantes para avaliar o impacto de estilo de vida, a progressão temporal das alterações gênicas e teciduais no eixo intestino-cérebro, bem como investigar intervenções terapêuticas potenciais que possam modular essas interações.

6 CONCLUSÕES

A DA é uma condição complexa e multifatorial, em que diferentes vias patológicas interagem para culminar na degeneração neuronal. Este trabalho explorou a relação entre a expressão diferencial de genes relacionados ao eixo intestino-cérebro e a fisiopatologia do Alzheimer, com o objetivo de ajudar na elucidação de como as alterações nesses genes podem influenciar, ou ser influenciadas, pelo SNC e pelo SNE, contribuindo para a compreensão dos mecanismos da DA. Os resultados mostraram que o gene *Slc25a5* apresentou superexpressão no hipocampo e no córtex em amostras do grupo Alzheimer, sugerindo uma tentativa de compensação energética associada à astrogliose. Contudo, essa superexpressão também está vinculada ao aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS), contribuindo para o estresse oxidativo, apoptose e a progressão da patologia. Por outro lado, o gene *Camk1d* apresentou redução significativa de expressão em amostras de cólon, sugerindo um impacto nos mecanismos de homeostase celular e maior suscetibilidade a danos neuronais. Este trabalho trouxe contribuições para a literatura ao integrar dados experimentais e perspectivas teóricas sobre o eixo intestino-cérebro no contexto da DA. Seus achados reforçam que os genes estudados têm papéis relevantes em processos neurodegenerativos e metabólicos tanto no cérebro quanto no intestino. Ressaltando a necessidade de uma abordagem interconectada no estudo dessas vias, considerando que elas não atuam de forma isolada, mas como partes interdependentes de um sistema altamente dinâmico. Essa perspectiva é essencial para desenvolver intervenções mais eficazes e personalizadas para essa complexa condição neurodegenerativa.

REFERÊNCIAS

- ALZHEIMER'S ASSOCIATION. 2023 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, v. 19, n. 4, p. 1598–1695, 14 mar. 2023
- ADEOLA, F. Normalization of Gene Expression by Quantitative RT-PCR in Human Cell Line: comparison of 12 Endogenous Reference Genes. *Ethiopian Journal of Health Sciences*, v. 28, n. 6, 1 jan. 1970.
- ADEWUYI, E. O. et al. Relationship of Cognition and Alzheimer's Disease with Gastrointestinal Tract Disorders: A Large-Scale Genetic Overlap and Mendelian Randomisation Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 24, p. 16199, 19 dez. 2022.
- BOYLE, Elizabeth I.; WENG, Shuai; GOLLUB, Jeremy; JIN, Heng; BOTSTEIN, David; CHERRY, J. Michael; SHERLOCK, Gavin. GO::TermFinder – Open source software for accessing Gene Ontology information and finding significantly enriched Gene Ontology terms associated with a list of genes. *Bioinformatics (Oxford, England)*, v. 20, n. 18, p. 3710–3715, 2004.
- CHEN, Y.-J. et al. An integrated bioinformatic investigation of mitochondrial solute carrier family 25 (SLC25) in colon cancer followed by preliminary validation of member 5 (SLC25A5) in tumorigenesis. *Cell Death and Disease*, v. 13, n. 3, 14 mar. 2022.
- CLÉMENÇON, B.; BABOT, M.; TRÉZÉGUET, V. The mitochondrial ADP/ATP carrier (SLC25 family): Pathological implications of its dysfunction. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 34, n. 2-3, p. 485–493, abr. 2013.
- DA SILVA, E. M. G. et al. Proteomic Analysis of a Rat Streptozotocin Model Shows Dysregulated Biological Pathways Implicated in Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 25, n. 5, p. 2772, 28 fev. 2024.
- DEL AGUILA, E. M.; DUTRA, M. B.; SILVA, J. T.; PASCHOALIN, V. M. Comparing protocols for preparation of DNA-free total yeast RNA suitable for RT-PCR. *BMC Mol Biol*, 2005 Apr 15;6:9. doi: 10.1186/1471-2199-6-9. PMID: 15833107; PMCID: PMC1097730.
- DERVEAUX, S.; VANDESOMPELE, J.; HELLEMANS, J. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods*, v. 50, n. 4, p. 227–230, abr. 2010.
- DISTRUTTI, E. et al. Modulation of Intestinal Microbiota by the Probiotic VSL#3 Resets Brain Gene Expression and Ameliorates the Age-Related Deficit in LTP. *PLoS ONE*, v. 9, n. 9, p. e106503, 9 set. 2014.
- FEI, M. et al. Bioinformatics analyses and experimental validation of the role of phagocytosis in low-grade glioma. *Environmental Toxicology*, 19 dez. 2023.
- FERREIRA, R.; WONG, R.; SCHLICHTER, L. C. KCa3.1/IK1 Channel Regulation by cGMP-Dependent Protein Kinase (PKG) via Reactive Oxygen Species and CaMKII in

Microglia: An Immune Modulating Feedback System? *Frontiers in Immunology*, v. 6, 8 abr. 2015.

FOSTER, J. A.; RINAMAN, L.; CRYAN, J. F. Stress & the gut-brain axis: Regulation by the microbiome. *Neurobiology of Stress*, v. 7, n. 7, p. 124–136, dez. 2017.

GERRING, Z. F. et al. An analysis of genetically regulated gene expression across multiple tissues implicates novel gene candidates in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research & Therapy*, v. 12, n. 1, 16 abr. 2020.

GITLER, A. D.; DHILLON, P.; SHORTER, J. Neurodegenerative disease: models, mechanisms, and a new hope. *Disease Models & Mechanisms*, v. 10, n. 5, p. 499–502, 1 maio 2017.

GRANT, P. et al. Effects of Specific Inhibitors for CaMK1D on a Primary Neuron Model for Alzheimer's Disease. *Molecules*, v. 26, n. 24, p. 7669–7669, 18 dez. 2021.

HAYDEN, M. R. Brain Injury: Response to Injury Wound-Healing Mechanisms and Enlarged Perivascular Spaces in Obesity, Metabolic Syndrome, and Type 2 Diabetes Mellitus. *Medicina*, v. 59, n. 7, p. 1337, 20 jul. 2023.

HORTIGA, João Vitor Mello. Estudo do canabidiol na patologia da doença de Alzheimer: uma análise de vias e genes candidatos. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2024.

HPA RNA-seq normal tissues (ID 231263) - BioProject - NCBI. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject?term=PRJEB4337&cmd=DetailsSearch>.

JACK, C. R. et al. Prevalence of Biologically vs Clinically Defined Alzheimer Spectrum Entities Using the National Institute on Aging–Alzheimer's Association Research Framework. *JAMA Neurology*, v. 76, n. 10, p. 1174, 1 out. 2019.

JIN, J. et al. Gut-derived β -amyloid: Likely a centerpiece of the gut–brain axis contributing to Alzheimer's pathogenesis. *Gut Microbes*, v. 15, n. 1, 22 jan. 2023.

KIM, B.; NOH, G. O.; KIM, K. Behavioural and psychological symptoms of dementia in patients with Alzheimer's disease and family caregiver burden: a path analysis. *BMC Geriatrics*, v. 21, n. 1, 5 mar. 2021.

KONG, L. et al. Research advances on CaMKs-mediated neurodevelopmental injury. *Archives of Toxicology*, 18 set. 2024.

KUMAR VATS, D. et al. Review Current and Emerging Treatment Options for Alzheimer's Disease. *Neurology Letters*, v. 2, n. 1, p. 1–5, 1 abr. 2023.

LI, W.; GAO, Y.; ZHANG, J.; WANG, X.; YIN, F.; LI, Z.; ZHANG, M. Universal DNA detection realized by peptide based carbon nanotube biosensors. *Nanoscale Adv*, 2019 Nov 21;2(2):717-723. doi: 10.1039/c9na00625g. PMID: 36133222; PMCID: PMC9417745.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, v. 25, n. 4, p.

402–408, dez. 2001.

MAHMOUD DAHAB et al. Neural stem cells characterization in the vagal complex of adult ovine brain: A combined neurosphere assay/RTqPCR approach. *Research in Veterinary Science*, v. 164, p. 105025–105025, 20 set. 2023.

MENESES, Murilo S. *Neuroanatomia Aplicada*. 4th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2024. E-book. p.179. ISBN 9788527740081.

NIESLER, B. et al. Disorders of the enteric nervous system — a holistic view. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, v. 18, n. 6, 29 jan. 2021.

NIKOLAC PERKOVIC, M. et al. Epigenetics of Alzheimer's Disease. *Biomolecules*, v. 11, n. 2, 30 jan. 2021.

NOTT, A.; HOLTMAN, I. R. Genetic insights into immune mechanisms of Alzheimer's and Parkinson's disease. *Frontiers in Immunology*, v. 14, 8 jun. 2023.

PAIDLEWAR, M. et al. Unveiling the role of astrogliosis in Alzheimer's disease Pathology: Insights into mechanisms and therapeutic approaches. *International Immunopharmacology*, v. 141, p. 112940, 17 ago. 2024.

PARLATO, R. et al. Regulation of proliferation and histone acetylation in embryonic neural precursors by CREB/CREM signaling. *Neurogenesis*, v. 1, n. 1, p. e970883–e970883, 1 jan. 2014.

PELLEGRINI, C. et al. Prodromal Intestinal Events in Alzheimer's Disease (AD): Colonic Dysmotility and Inflammation Are Associated with Enteric AD-Related Protein Deposition. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 10, p. 3523, 15 maio 2020.

PILS, M. et al. Elevated A β aggregates in feces from Alzheimer's disease patients: a proof-of-concept study. *Alzheimer's Research & Therapy*, v. 16, n. 1, 14 out. 2024.

RAMOS, J. M. Fluorescent In Situ Hybridization (FISH). *Methods in Molecular Biology*, p. 179–189, 3 dez. 2021.

RIASCOS, D. et al. Alterations of Ca²⁺-responsive proteins within cholinergic neurons in aging and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, v. 35, n. 6, p. 1325–1333, 1 jun. 2014.

RICCIARELLI, R. et al. Microarray Analysis in Alzheimer's Disease and Normal Aging. *IUBMB Life*, v. 56, n. 6, p. 349–354, 1 jun. 2004.

SHELTONS, P. Alzheimer's disease. *The Lancet*, v. 397, n. 10284, p. 1577–1590, 24 abr. 2021.

SUMEL ASHIQUE et al. Gut-Brain Axis: A Cutting-Edge Approach to Target Neurological Disorders and Potential Synbiotic Application. *Heliyon*, p. e34092–e

SUN, Y. et al. Intra-gastrointestinal amyloid- β 1–42 oligomers perturb enteric function and induce Alzheimer's disease pathology. *The Journal of Physiology*, v. 598, n. 19, p. 4209–4223, 6 jul. 2020.

VALDEZ-GAXIOLA, C. A. et al. Early- and Late-Onset Alzheimer's Disease: Two Sides of the Same Coin? *Diseases*, v. 12, n. 6, p. 110, 1 jun. 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dementia. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>>.

YOKOYAMA, M. et al. Mouse Models of Alzheimer's Disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, v. 15, n. 1, 21 jun. 2022.

ZANETTI, Marcus V.; TADDEI, Carla R.; MAYER, Emeran. Eixo intestino-cérebro: teoria e aplicações clínicas. Barueri: Manole, 2024. E-book. p.56. ISBN 9788520463819.

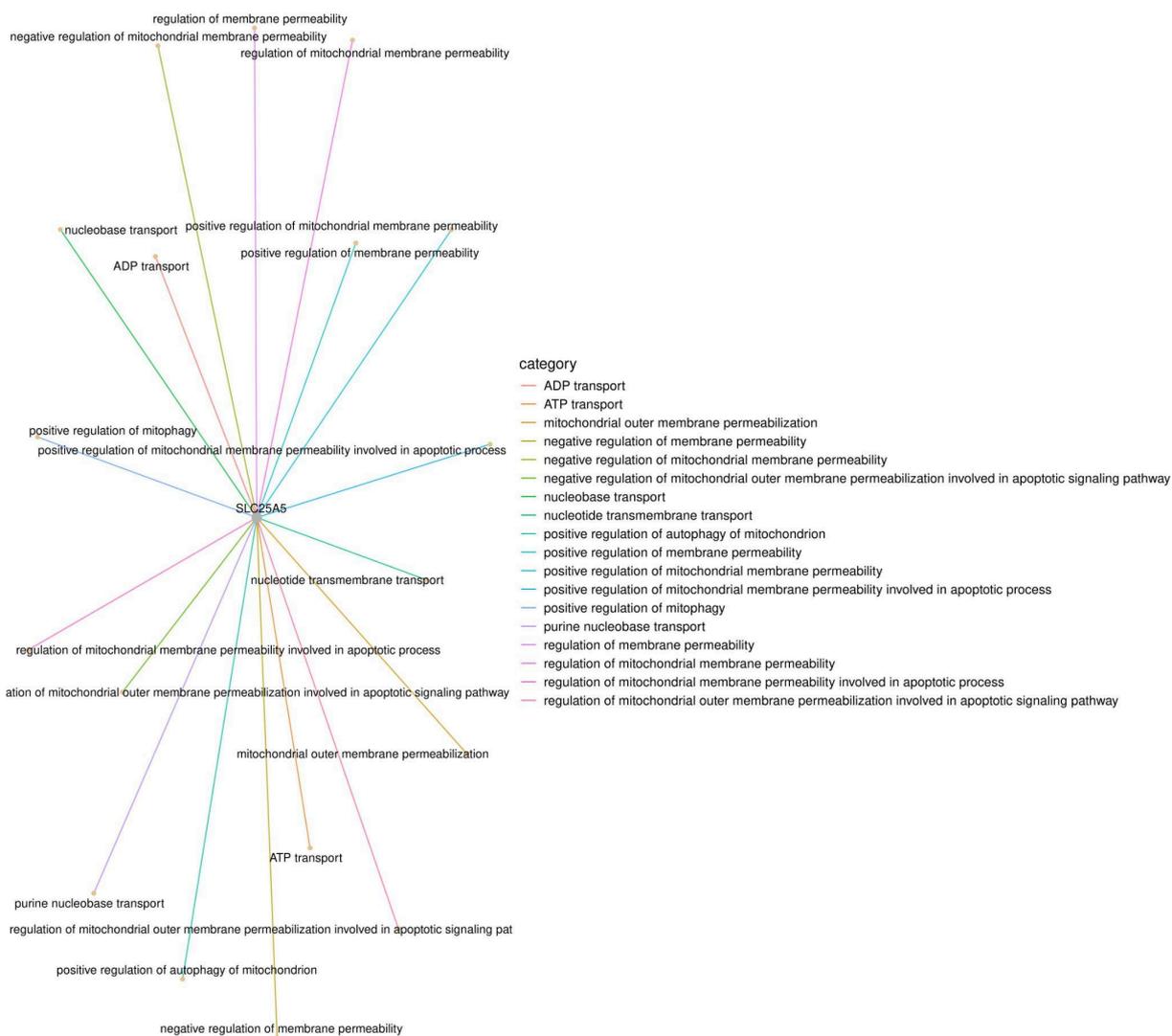
WIEGARD, J. C. et al. Northern Blot Detection of Tiny RNAs. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, v. 2300, p. 41–58, 2021.

WOOD, J. D. Integrative Functions of the Enteric Nervous System. *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, p. 671–688, 2012.

APÊNDICES

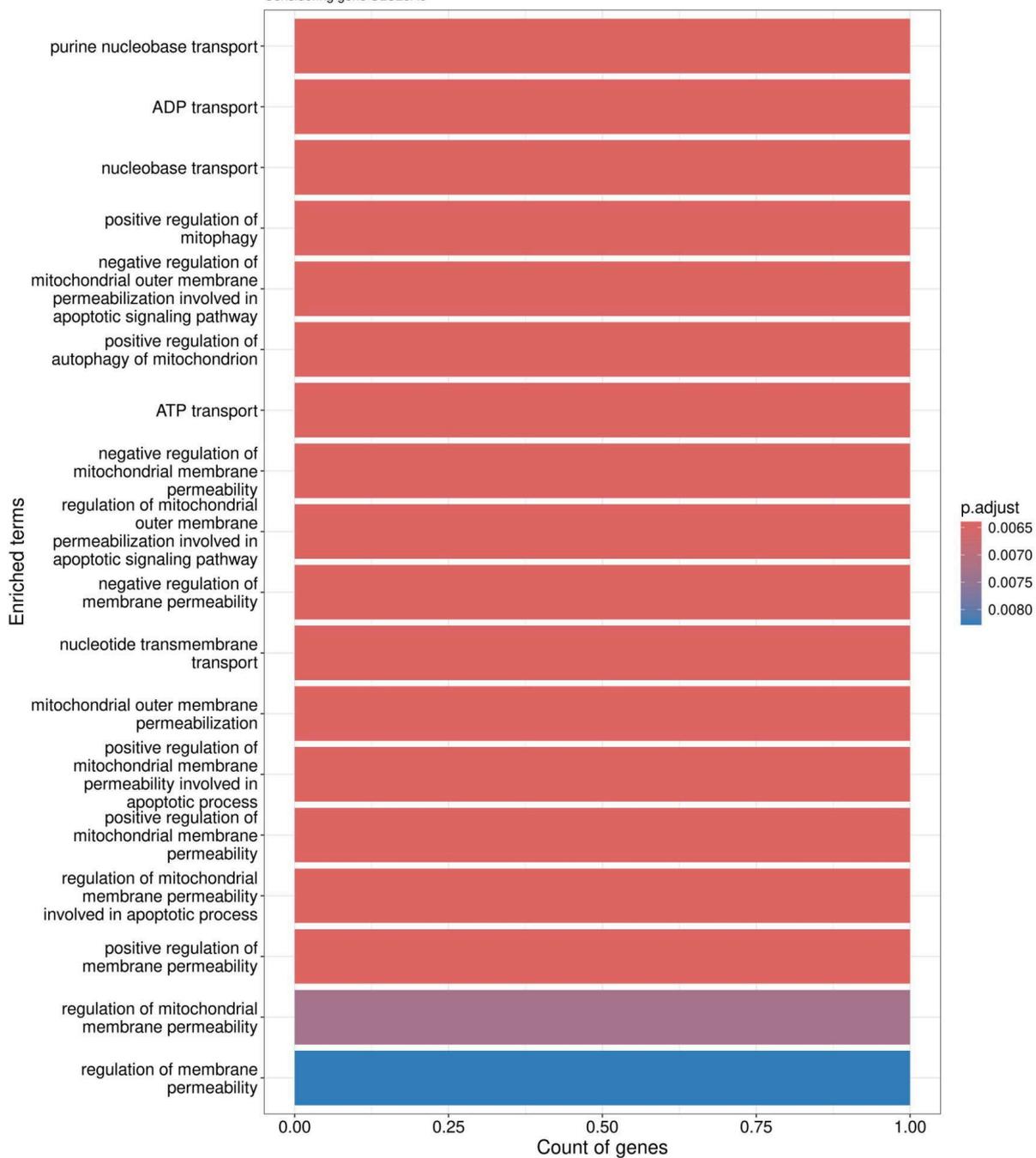
APÊNDICE 1 – Análise ORA, Gráficos de barras e diagramas de Interação gênica para os genes *CAMK1D* e *SLC25A5*.

and gut-brain-axis Over-representation Analysis - Gene Ontology BP
Considering gene SLC25A5

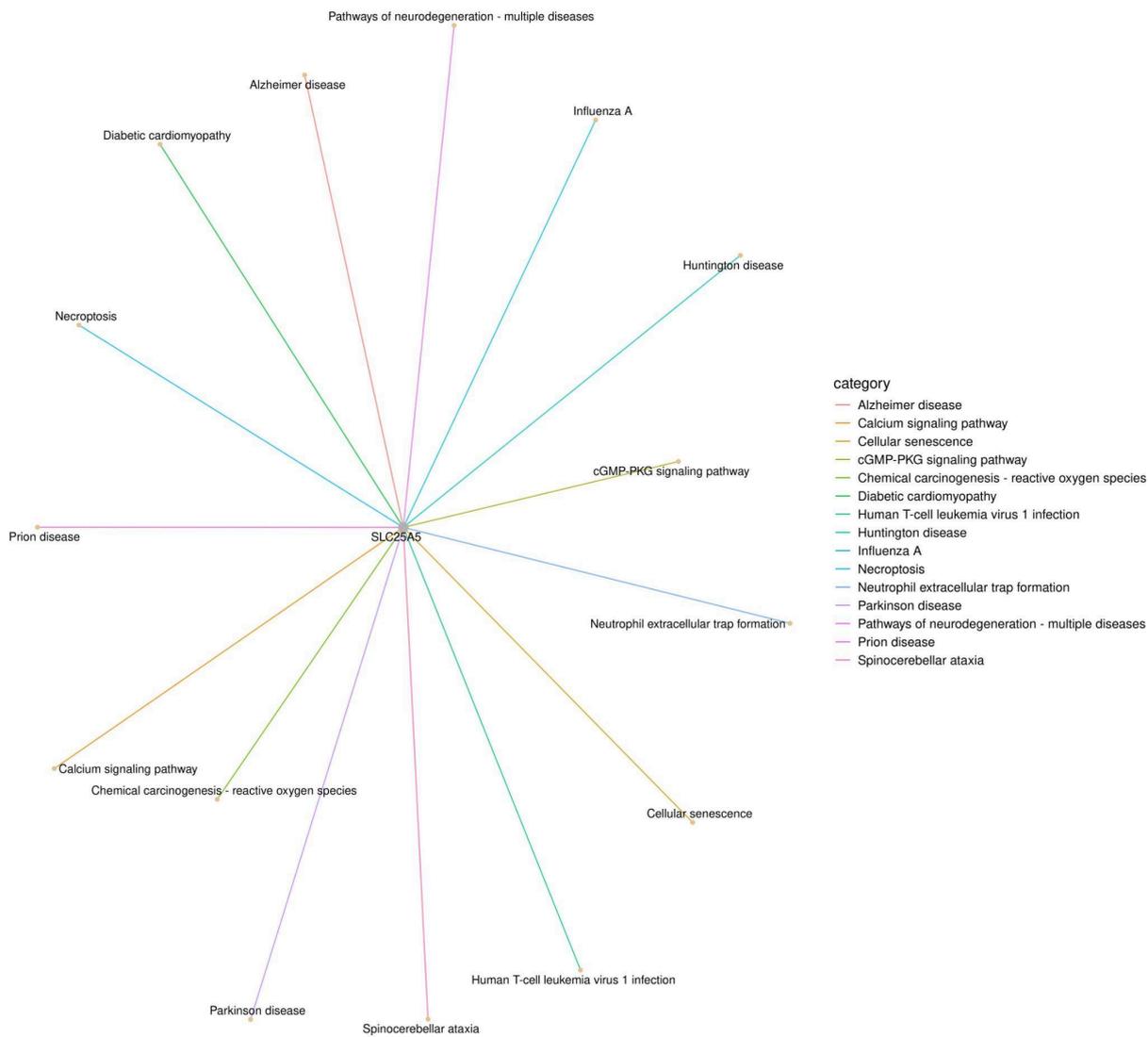


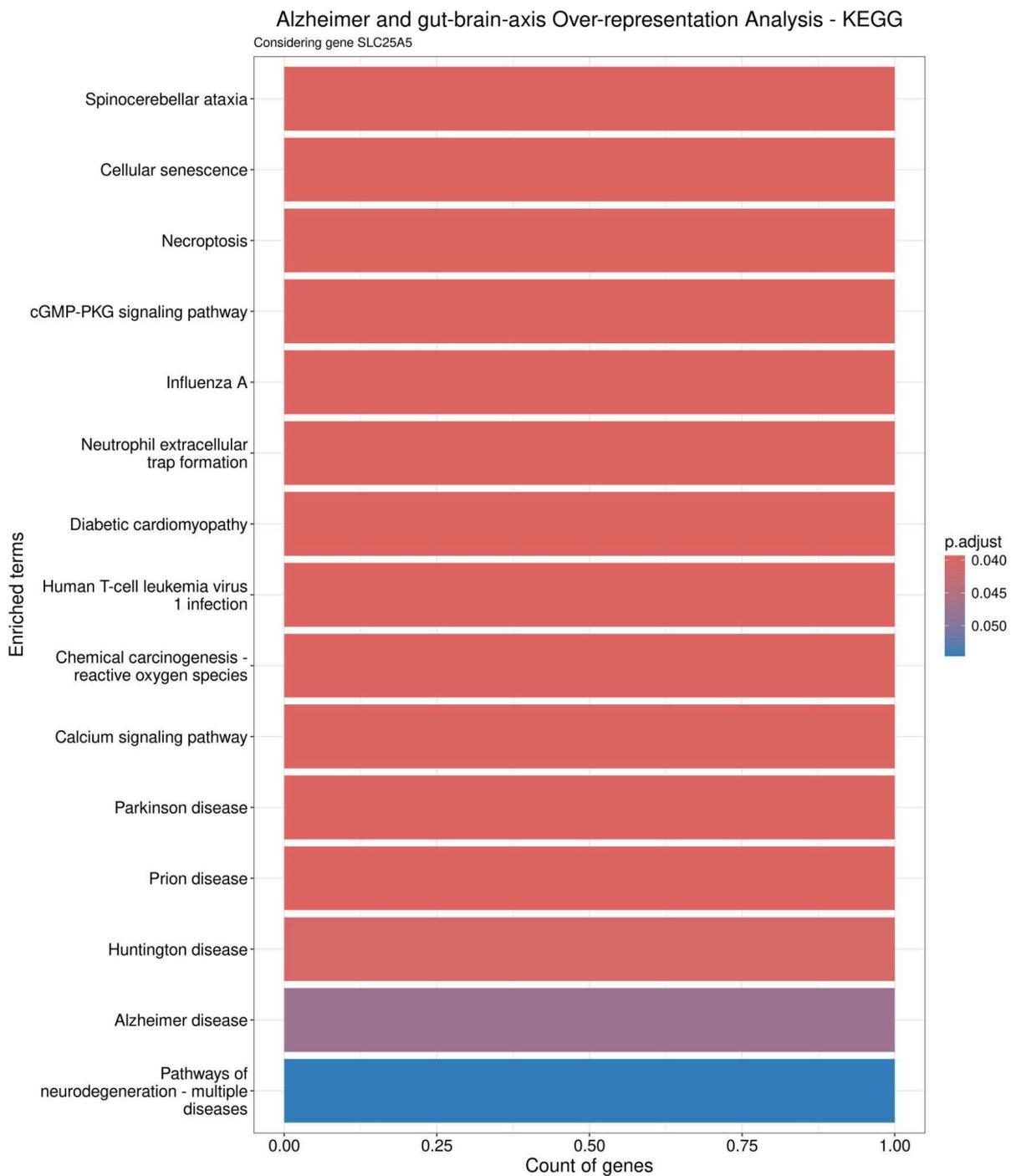
Alzheimer and gut-brain-axis Over-representation Analysis - Gene Ontology BP

Considering gene SLC25A5

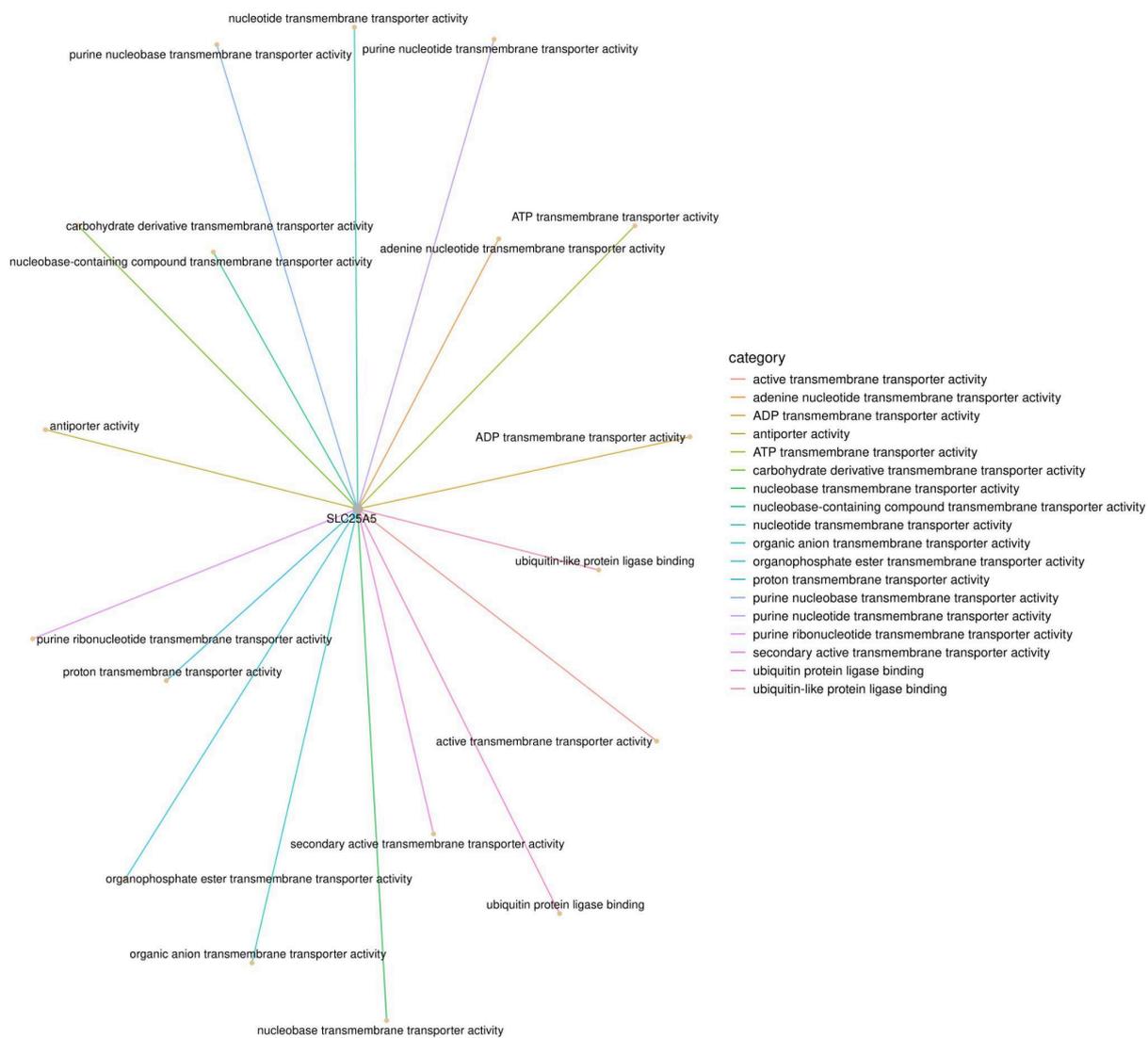


Alzheimer and gut-brain-axis Over-representation Analysis - KEGG
 Considering gene SLC25A5



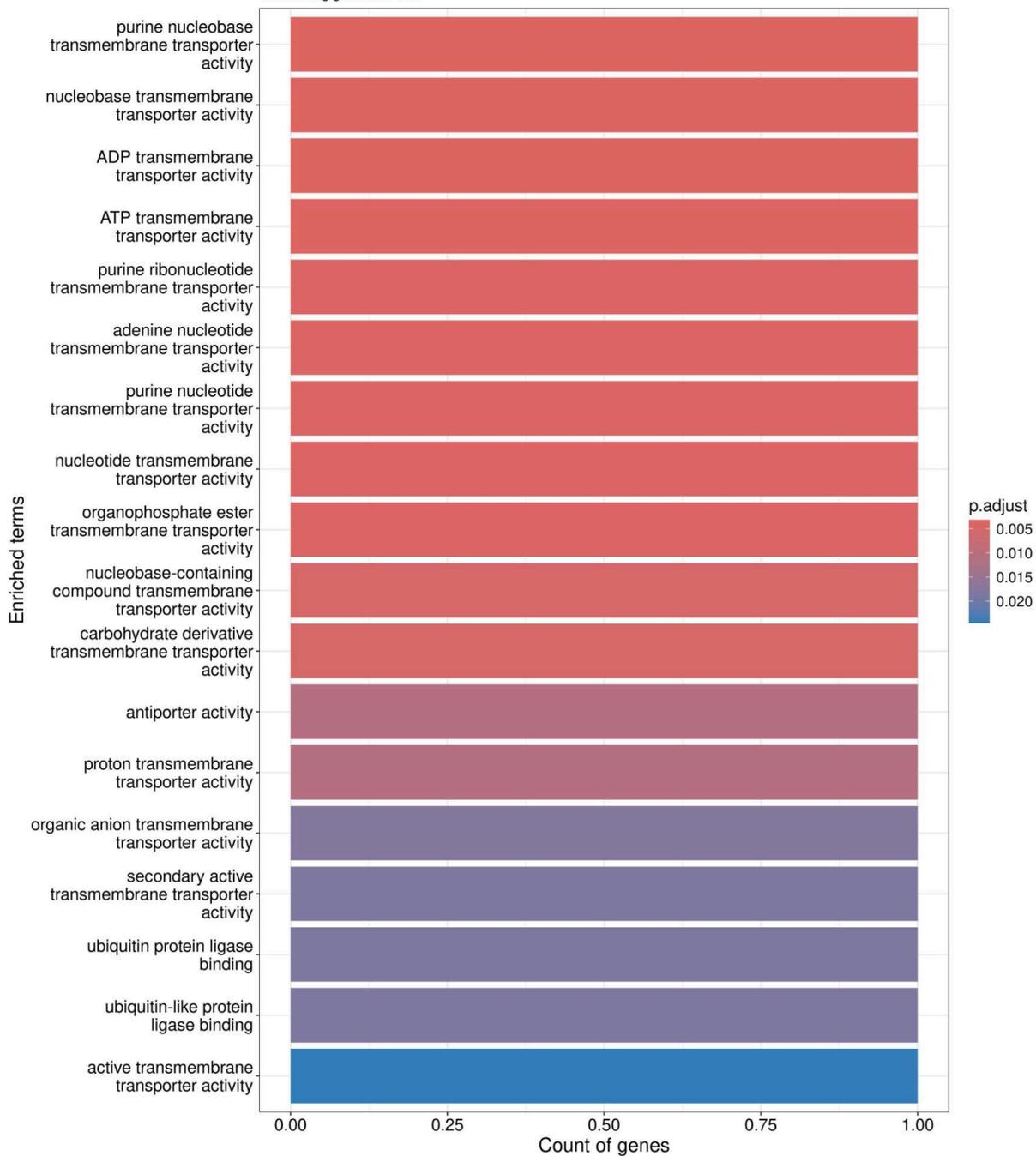


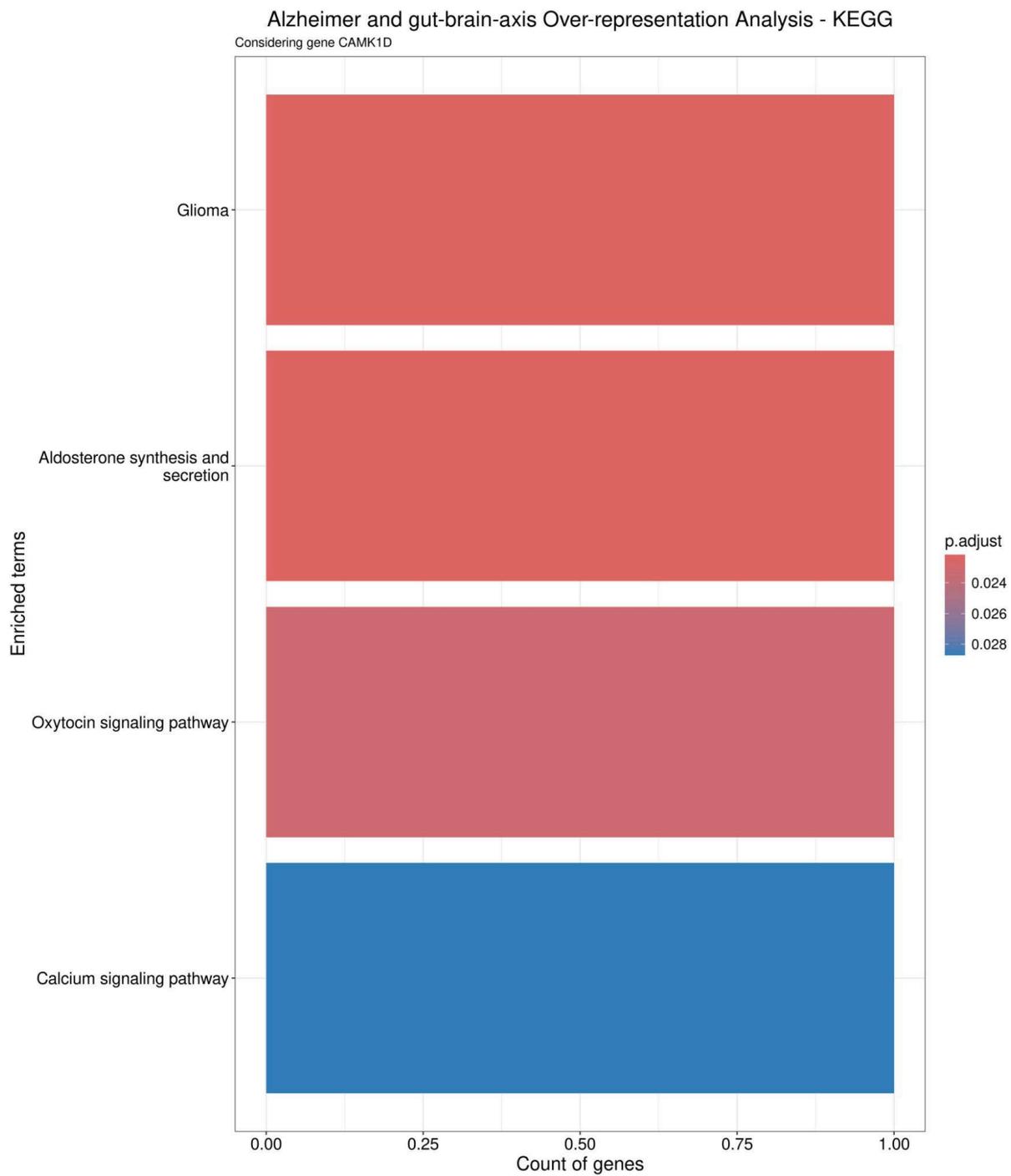
Alzheimer and gut-brain-axis Over-representation Analysis - Gene Ontology MF
Considering gene SLC25A5

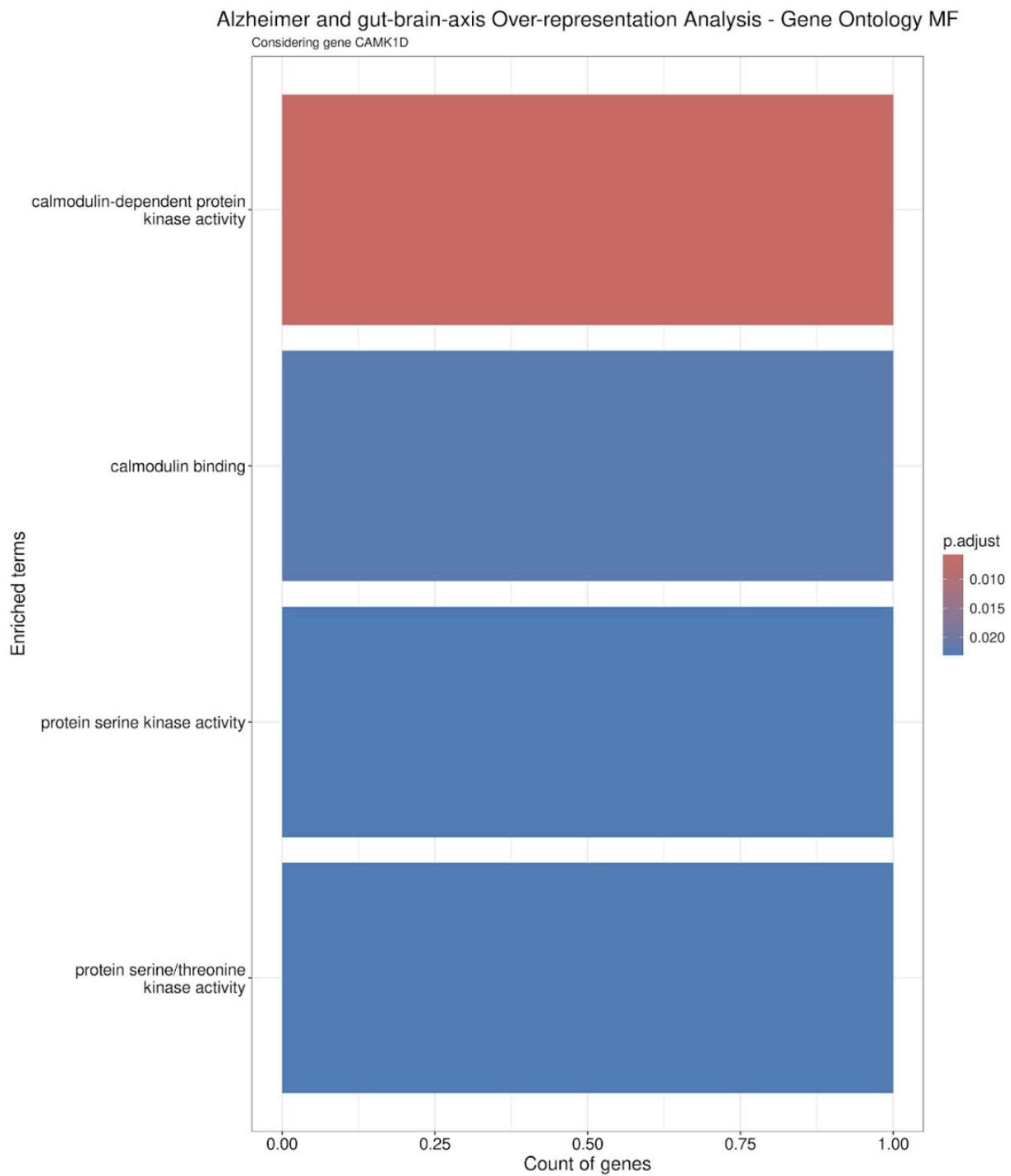


Alzheimer and gut-brain-axis Over-representation Analysis - Gene Ontology MF

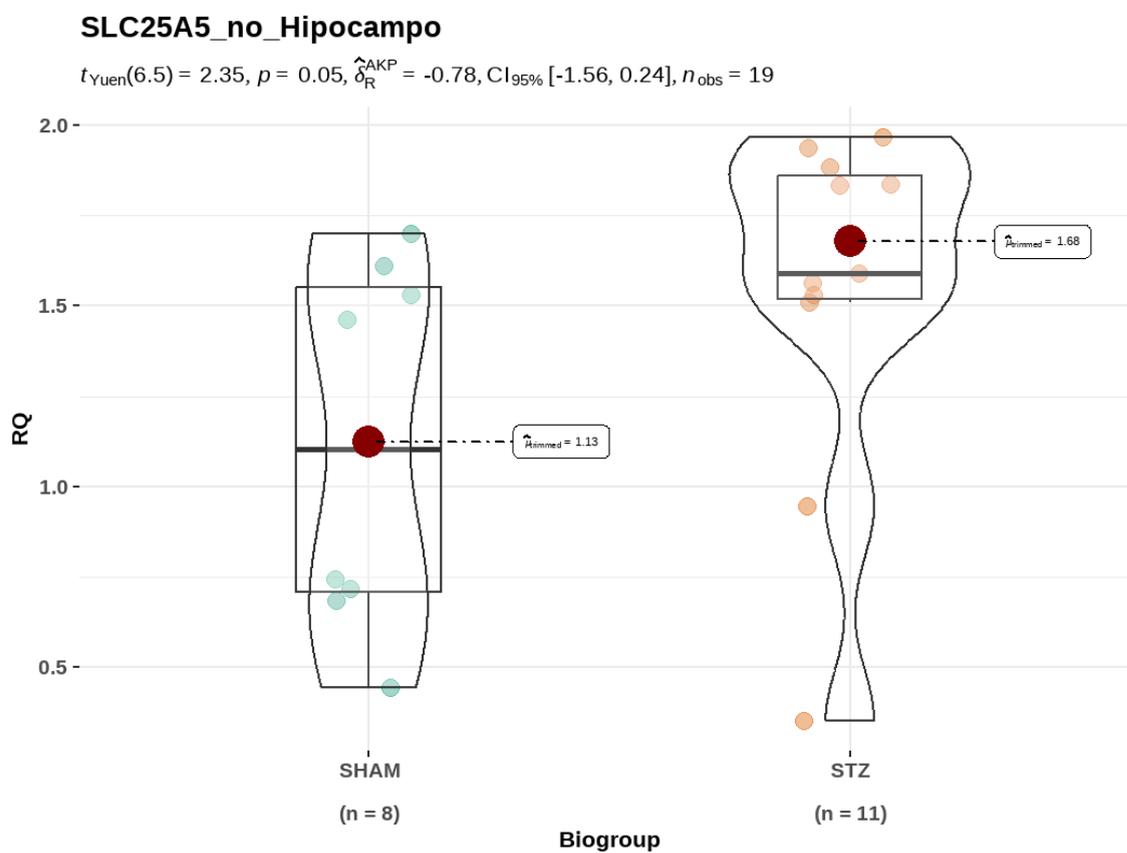
Considering gene SLC25A5





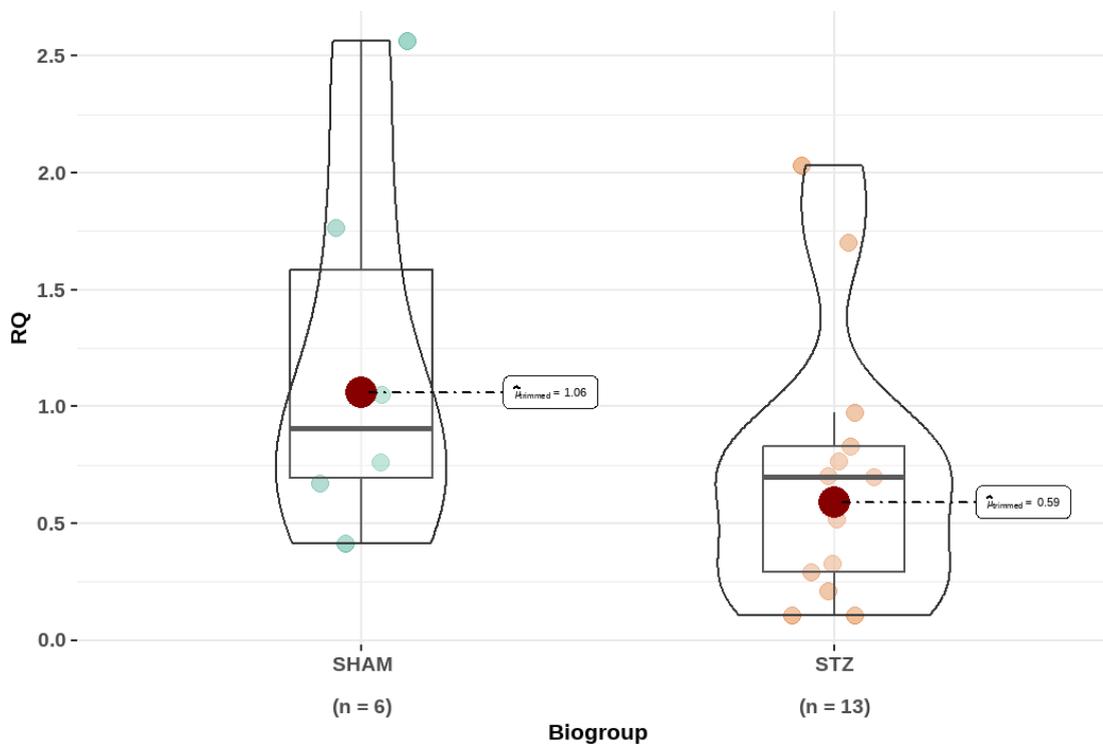


APÊNDICE 2 – Gráficos violino com os valores de quantificação relativa de Slc25a5 e Camk1d relacionados ao Gapdh (controle endógeno). Os gráficos foram gerados pelo *software R*.



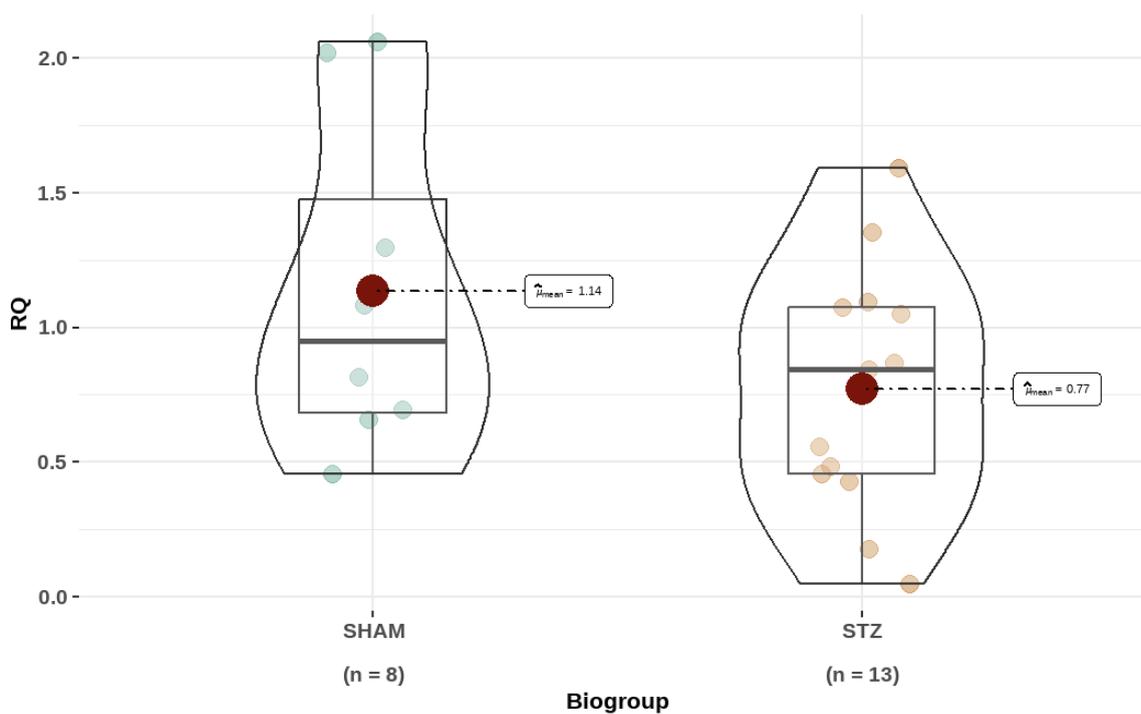
SLC25A5_no_Cólon

$t_{\text{Yuen}}(3.87) = 1.30, p = 0.26, \hat{\delta}_R^{\text{AKP}} = 0.58, \text{CI}_{95\%} [-0.89, 2.68], n_{\text{obs}} = 19$



CAMK1D_no_Hipocampo

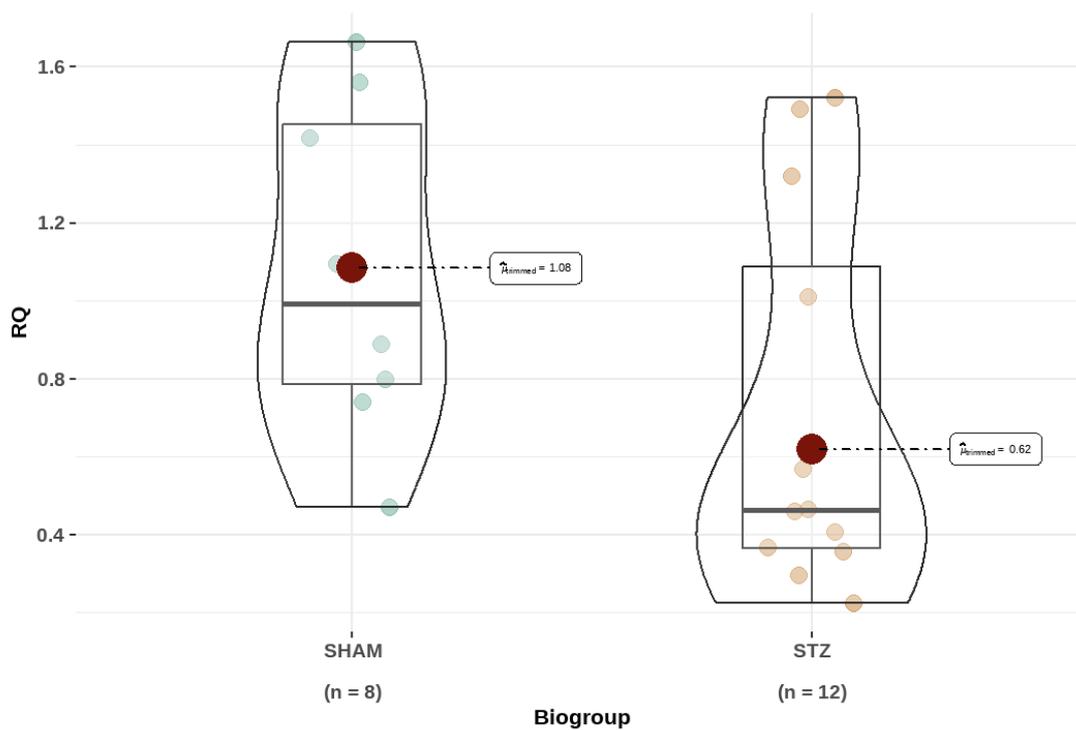
$t_{\text{Student}}(19) = 1.55, p = 0.14, \hat{g}_{\text{Hedges}} = 0.63, \text{CI}_{95\%} [-0.27, 1.50], n_{\text{obs}} = 21$



$\log_e(\text{BF}_{01}) = 0.10, \hat{\delta}_{\text{difference}}^{\text{posterior}} = 0.25, \text{CI}_{95\%}^{\text{ETI}} [-0.14, 0.69], r_{\text{Cauchy}}^{\text{JZS}} = 0.71$

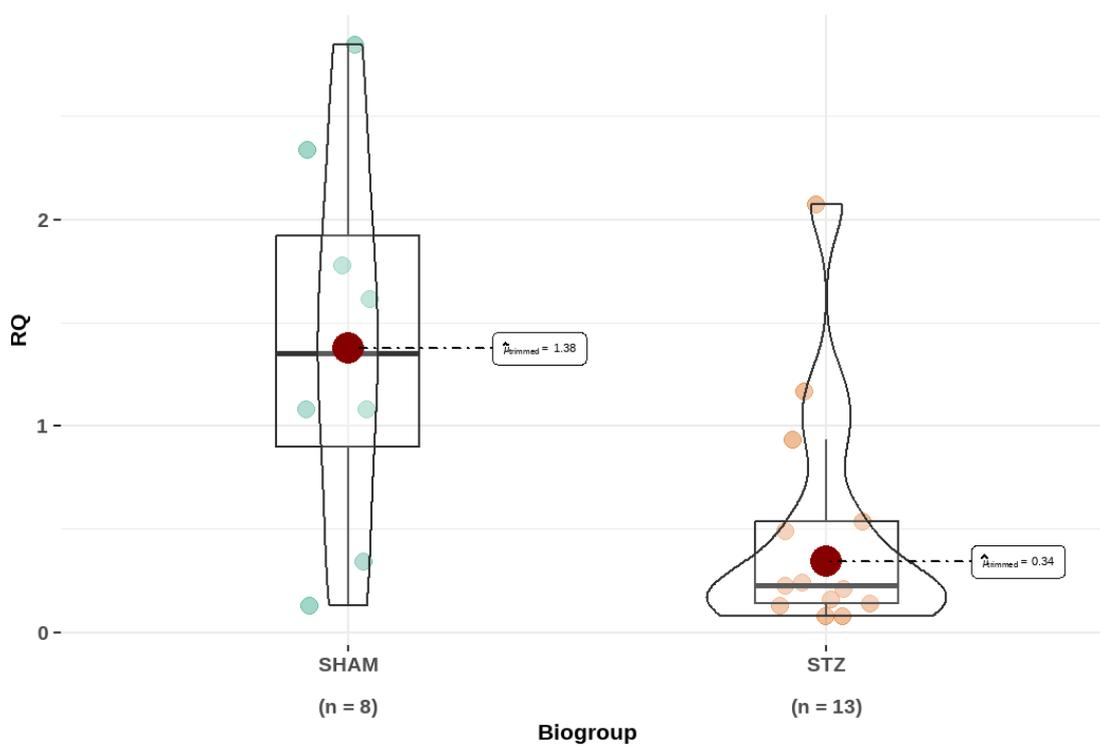
CAMK1D_no_Córtex

$t_{\text{Yuen}}(11.85) = 1.82, p = 0.09, \hat{\delta}_R^{\text{AKP}} = 0.82, \text{CI}_{95\%} [-0.07, 1.74], n_{\text{obs}} = 20$



CAMK1D_no_Cólon

$t_{\text{Yuen}}(6.27) = 2.55, p = 0.04, \hat{\delta}_R^{\text{AKP}} = 0.84, \text{CI}_{95\%} [0.23, 2.99], n_{\text{obs}} = 21$



APÊNDICE 3 – Tabela com o valores de Ct obtidos pela técnica de qPCR, para os genes Slc25a5, Camk1d e Gapdh.

LEGENDA: Ct Mean- média da triplicata dos Cts e Ct SD - desvio padrão.

Nº	Grupo	SLC25A						CAMK1D						GAPDH					
		Hipocampo Ct Mean	Hipocampo Ct SD	Córtex Ct Mean	Córtex Ct SD	Intestino Ct Mean	Intestino Ct SD	Hipocampo Ct Mean	Hipocampo Ct SD	Córtex Ct Mean	Córtex Ct SD	Intestino Ct Mean	Intestino Ct SD	Hipocampo Ct Mean	Hipocampo Ct SD	Córtex Ct Mean	Córtex Ct SD	Intestino Ct Mean	Intestino Ct SD
1	STZ	20,824	0,039	27,770	0,230	26,612	0,233	22,652	0,989	27,725	0,479	28,034	0,180	16,923	0,150	23,989	0,694	27,515	0,493
2	STZ	20,467	0,140	27,834	1,129	23,684	0,153	21,374	0,410	26,579	0,235	25,538	0,181	16,246	0,307	23,249	1,163	23,069	0,150
3	STZ	22,892	0,421	26,753	0,246	23,703	0,556	24,346	0,196	28,033	0,170	26,018	0,194	23,640	0,297	23,661	1,347	26,076	0,143
4	STZ	19,351	2,294	26,677	0,455	31,887	0,561	22,410	0,328	27,392	0,144	31,942	0,732	17,554	0,094	23,196	0,858	31,511	0,874
5	STZ	22,684	0,174	24,451	0,059	26,259	0,252	22,503	0,305	25,204	0,436	27,081	0,314	17,690	0,408	19,696	0,289	25,413	0,264
6	STZ	21,444	0,362	22,696	0,271	25,764	0,110	22,677	0,260	23,043	0,018	26,897	0,207	17,183	0,408	16,944	0,490	27,134	0,300
7	STZ	21,670	0,263	21,831	0,446	22,437	0,026	22,912	0,120	23,223	0,081	25,956	0,059	17,750	0,259	17,152	0,327	23,165	0,123
8	SHAM	21,231	0,330	26,194	0,812	26,798	0,296	23,478	0,543	26,300	0,404	28,221	0,354	17,377	0,363	21,896	0,604	27,193	0,200
9	SHAM	21,969	0,591	23,762	0,458	21,664	0,182	22,502	0,088	25,382	0,190	24,758	0,134	17,974	0,032	19,384	0,692	21,361	0,078
10	STZ	22,813	0,576	28,072	0,423	28,979	0,156	22,760	0,615	26,696	0,252	28,272	0,215	18,838	0,497	22,650	0,920	28,616	0,018
11	STZ	22,921	0,197	23,379	0,527	32,733	0,967	22,648	0,479	24,256	0,366	31,685	0,642	18,638	0,618	17,816	0,330	32,801	0,165
12	STZ	21,905	0,637	22,301	0,469	28,832	0,214	22,914	0,091	23,530	0,207	28,729	0,328	17,723	0,273	17,636	0,127	27,183	0,396
13	STZ	22,864	0,529	24,058	0,267	31,621	0,395	22,518	0,576	23,969	0,219	28,611	0,332	18,680	0,569	19,960	0,275	29,715	0,453
14	STZ	22,090	0,592	23,953	0,186	21,811	0,237	22,350	0,586	24,147	0,528	24,931	0,351	18,138	0,574	19,467	0,448	21,312	0,097
15	STZ	23,282	0,555	24,720	0,224	30,230	0,498	22,618	0,138	23,833	0,317	32,908	2,534	20,055	0,765	19,441	3,313	32,579	0,188
16	SHAM	21,460	0,177	23,830	0,134	22,646	0,061	23,251	0,071	26,103	0,127	25,482	0,026	19,321	0,942	20,780	0,241	21,692	0,136
17	SHAM	21,247	0,074	21,523	0,068	23,544	0,133	23,187	0,247	23,732	0,302	26,314	0,062	18,420	0,029	17,594	0,049	23,056	0,198
18	SHAM	21,700	0,226	21,488	0,154	27,827	0,467	23,211	0,089	24,709	0,152	27,511	0,079	17,779	0,074	18,480	0,074	24,831	0,189
19	SHAM	21,118	0,385	22,061	0,357			23,531	0,092	24,438	0,590	30,371	0,556	18,356	0,082	18,813	0,101	30,768	0,403
20	SHAM	22,291	0,054	22,561	0,097	30,683	0,501	23,866	0,166	23,720	0,449	31,121	1,375	19,409	0,032	18,660	0,364	28,441	0,121
21	SHAM	22,339	0,071	22,444	0,181	23,349	0,144	24,338	0,142	23,682	0,064	25,723	0,261	18,265	0,080	18,512	0,089	21,648	0,066

*Branco e RT- não amplificaram

*Branco e RT- não amplificaram

*Branco e RT- não amplificaram